

Aus der Neurologischen Klinik mit klinischer Neurophysiologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
Direktor: Prof. Dr. Reinhard Dengler

**Effekte von immunmodulatorischer Therapie
mit Interferon- β und Glatiramerazetat auf die
Expression kosignalisierender Moleküle bei
Patienten mit Multipler Sklerose**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Milani Deb
aus Salzgitter

Hannover 2009

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 13.04.2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuerin: Prof. Dr. med. Anja Windhagen

Referent: Prof. Dr. med. Matthias Stoll

Korreferent: Prof. Dr. med. Dirk Stichtenoth

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2010

Promotionsausschussmitglieder: Prof. Dr. Hermann Müller-Vahl
Prof. Dr. Marc Ziegenbein
Prof. Dr. Frank Schuppert

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1 Einleitung	6
1.1 Bedeutung der vorliegenden Arbeit	6
1.2 Multiple Sklerose	8
1.3 Pathogenese und Immunologie der Multiplen Sklerose	11
1.4 Aktuelle Therapieformen	15
1.5 Einzelne Komponenten des Immunsystems und ihre Relevanz für die Multiple Sklerose	17
1.5.1 <i>Lymphozyten und Monozyten</i>	17
1.5.2 <i>Kosignalisierende Moleküle und deren Rolle bei der Multiplen Sklerose</i>	24
1.6 Interferon- β (IFN- β)	33
1.7 Glatiramerazetat (GA)	37
1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	41
2 Material und Methoden	43
2.1 Patienten	43
2.2 Responder und Non-Responder	45
2.3 Zellisolierung und -stimulation	46
2.4 Durchfluss (Flow-) Zytometrie	48
2.5 Antikörper gegen IFN- β im Serum von MS-Patienten	52
2.6 Statistische Analyse	53
2.7 Verwendete Antikörper und Materialien....	54
2.7.1 <i>Antikörper</i>	54
2.7.2 <i>Materialien</i>	55
3 Ergebnisse	57
3.1 Effekte von IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle <i>in vitro</i> : Hochregulation der Expression von PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten und PD-L1 auf CD4 ⁺ -T-Zellen	57
3.1.1 <i>Effekte von IFN-β auf Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten</i>	57
3.1.2 <i>Effekte von IFN-β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten</i>	60
3.2 Effekte der IFN- β -Therapie bei MS-Patienten: Hochregulation von CD86, CD80, CD40, PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten und von PD-L1 auf CD4 ⁺ -T-Zellen <i>ex vivo</i>	62
3.2.1 <i>Effekte der Therapie mit IFN-β auf die Expression</i>	

<i>kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten</i>	63
3.2.2 <i>Effekte der Therapie mit IFN-β auf die Expression</i> <i>kosignalisierender Moleküle auf Monozyten</i>	64
3.3 Zunahme der Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten korreliert mit positivem Ansprechen auf eine IFN- β - Therapie	66
3.4 Therapieansprechen ist nicht mit Antikörpern gegen IFN- β assoziiert	71
3.5 Bereits drei Monate nach Behandlungsbeginn mit IFN- β zeigen CD80, CD86 und CD40 die stärkste Hochregulation der Expression auf Monozyten	72
3.6 Effekte von GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle <i>in vitro</i> : Hochregulation der Expression von CD80, CD86 und CD40 auf Monozyten	75
3.6.1 <i>Effekte von GA auf Expression kosignalisierender</i> <i>Moleküle auf Lymphozyten</i>	75
3.6.2 <i>Effekte von GA auf die Expression kosignalisierender</i> <i>Moleküle auf Monozyten</i>	78
3.7 Effekte der GA-Therapie bei MS-Patienten <i>ex vivo</i> : keine Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten und Monozyten	81
3.7.1 <i>Effekte der Therapie mit GA auf die Expression</i> <i>kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten</i>	81
3.7.2 <i>Effekte der Therapie mit GA auf die Expression</i> <i>kosignalisierender Moleküle auf Monozyten</i>	82
3.8 GA führt weder auf Lymphozyten noch auf Monozyten zu signifikanten Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle über die ersten zwölf Monate nach Behandlungsbeginn <i>in vivo</i>	84
4 Diskussion	86
4.1 Interferon- β	86
4.2 Glatiramerazetat	94
5 Zusammenfassung	98
6 Referenzen	102
Lebenslauf	116
Veröffentlichungen, Kongressbeitrag/Auszeichnung	118
Erklärung	119
Danksagung	121

Abkürzungen

ANOVA	analysis of variance (univariate Varianzanalyse)
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APL	altered peptide ligand
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	cluster of differentiation
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Glatiramerazetat
HLA	human leukocyte antigene
ICOS	inducible costimulator protein
ICOSL	inducible costimulator protein ligand
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MBP	Myelin-basisches Protein
MFI	durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität
MHC	Major-Histokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOG	Myelin-Oligodendrozyt-Glykoprotein
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NGF	nerve growth factor
NK	Natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphatpufferlösung
PD	programmed death
PD-L	programmed death-ligand
PE	Phycoerythrin
PLP	Proteolipidprotein
RT-PCR	Real-Time-PCR
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helferzelle
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der vorliegenden Arbeit

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche, demyelinisierende (entmarkende) Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Die höchsten Prävalenzen sind im jungen Erwachsenenalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr zu verzeichnen. Die MS ist einer der häufigsten Gründe für neurologische Ausfallserscheinungen und Frühinvalidität im jungen Erwachsenenalter.

Die Ätiologie dieser Erkrankung ist bislang unzureichend geklärt. Es handelt sich am ehesten um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, bei der unter anderem genetische sowie auch umweltbedingte Faktoren zu einer autoimmun-vermittelten Schädigung von Markscheiden im ZNS führen. T-Lymphozyten spielen hierbei eine wesentliche Schlüsselrolle. Es kommt zu einer aberranten Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, die ins ZNS einwandern und dort über verschiedene Effektormechanismen Gewebsschäden hervorrufen.

Eine kausale Therapie der Multiplen Sklerose gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht. Die aktuelle Therapie der häufigsten Verlaufsform dieser Erkrankung (schubförmig-remittierender Verlauf, RR-MS) besteht zum einen in einer symptomatischen und zum anderen in einer immunmodulierenden Behandlung.

Als immunmodulatorische Therapien sind die Substanzen Interferon-beta (IFN- β) und Glatiramerazetat (GA) klinisch etabliert. Beide Substanzen führen zu einer Reduktion der Schubrate und der Ausbildung neuer Entzündungsherde im ZNS (1;2). Es gibt allerdings auch Patienten, die nicht auf diese Behandlung ansprechen. Der genaue molekulare Wirkmechanismus als auch die pathophysiologischen Ursachen des fehlenden Ansprechens auf die Behandlung mit IFN- β und GA sind unzureichend geklärt. Zur Optimierung der MS-Therapie wäre die Identifikation von prädiktiven Markern wünschenswert, um das Ansprechen auf die jeweilige Behandlung frühzeitig beurteilen zu können.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass kosignalisierende Moleküle eine wichtige Funktion bei der Regulation der T-Zell-Aktivierung einnehmen und die Expression dieser Moleküle bei der MS und anderen Autoimmunerkrankungen verändert ist (3-7). Es ergaben sich auch Hinweise darauf, dass durch die Immunmodulatoren IFN- β und GA kosignalisierende Moleküle direkt beeinflusst werden können.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Effekte von IFN- β und GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten und Monozyten *in vitro* und *ex vivo* untersucht sowie Änderungen in der Expression mit dem klinischen Ansprechen der Patienten mit Multipler Sklerose auf die Therapie korreliert. Ziel der Untersuchungen war es, spezifische prädiktive Marker zu identifizieren, die möglichst früh nach Behandlungsbeginn auf ein positives bzw. negatives Ansprechen auf die IFN- β - oder GA- Therapie

hinweisen und so eine schnellere Identifikation von sogenannten „Non-Respondern“ ermöglichen.

1.2 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose gehört zu den häufigsten und wichtigsten neurologischen Erkrankungen des jungen Erwachsenenalters. Weltweit sind ca. 2,5 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen. In Deutschland geht man von über 100.000 betroffenen Menschen aus (8). Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer. Die Inzidenzrate wird jährlich auf ca. 4000 Neuerkrankte geschätzt (9). Die Erkrankung hat ein typisches geographisches Verteilungsmuster. In den nördlichen Breitengraden sind die Prävalenzen höher als in den südlichen Breitengraden.

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bisher unzureichend ergründet. Man geht von einer multifaktoriellen Genese aus. Dabei scheinen vor allem eine genetische Prädisposition, Umweltfaktoren und infektiöse Erreger eine wichtige Rolle zu spielen. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit liegt bei Geschwistern oder Verwandten etwas höher als bei Personen ohne Krankheitsfälle in der Familie. Es handelt es sich jedoch nicht um eine klassische Erbkrankheit (10-12).

Die Multiple Sklerose kann in unterschiedlichen Formen verlaufen (13). Die mit 80-90% häufigste Form ist der schubförmig-remittierende Verlauf (RR-MS). Ein

Schub ist definiert als ein subakutes (innerhalb von Stunden bis Tagen) Auftreten neurologischer Ausfälle mit einer Dauer von mindestens 24 Stunden. Die Dauer eines Schubes beträgt in der Regel einige Tage bis Wochen, wobei es zu einer kompletten oder inkompletten Remission der Schubsymptomatik kommen kann (*Abb. 1*).

Bei ca. 70% der Patienten geht nach etwa zehn Jahren der initiale schubförmig-remittierende Verlauf in eine sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform (SP-MS) über (14). Es kommt zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der neurologischen Symptome.

Nur ca. 15% der Patienten leiden an der primär chronisch-progredienten Verlaufsform (PP-MS). Kennzeichnend ist die stetige Verschlechterung der neurologischen Symptomatik seit dem erstmaligen Auftreten der Ausfälle (15).

Der Krankheitsverlauf eines einzelnen Patienten kann nur individuell im Verlauf der Erkrankung abgeschätzt werden. Als prognostisch ungünstige Faktoren zu Beginn der Erkrankung gelten z.B. eine initial hohe Anzahl entzündlicher Läsionen in der Kernspintomographie (MRT), ein polysymptomatischer Beginn oder auch der Beginn mit einer motorischen oder zerebellären Ausfallsymptomatik sowie eine schlechte Rückbildung der Schübe.

Aufgrund der verbesserten symptomatischen Therapieoptionen ließ sich eine sinkende Tendenz der Sterblichkeitsrate feststellen. Die Lebenserwartung liegt ca. 5-10 Jahre unter der von Nichterkrankten (16).

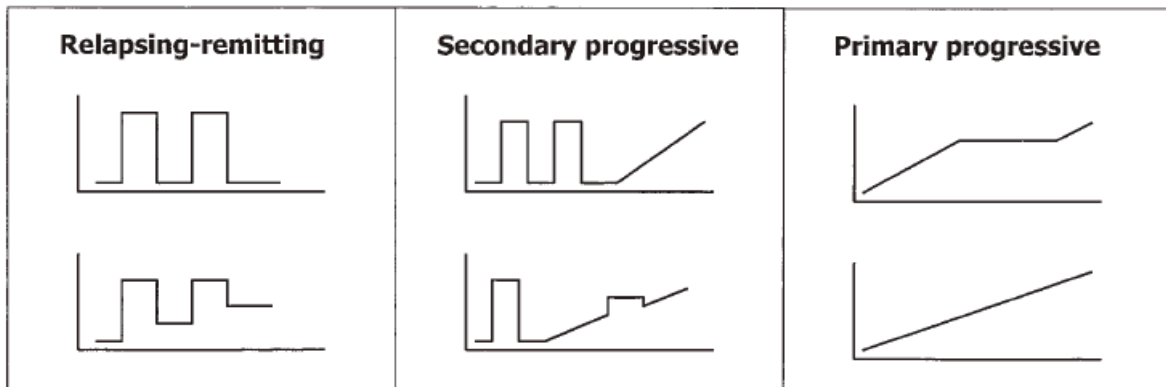


Abb. 1 Vereinfachte Darstellung der Verlaufsformen bei der Multiplen Sklerose: schubförmig-remittierend (RR-MS), sekundär chronisch-progredient (SP-MS), primär chronisch-progredient (PP-MS) (Aus [modifiziert]: Kieseier BC, Hartung HP. *Current disease-modifying therapies in multiple sclerosis. Semin Neurol.* 2003 Jun;23(2):133-46.)

Die Symptome der Multiplen Sklerose sind vielfältig. Sehstörungen (Optikusneuritis mit Visusminderung etc.) und Sensibilitätsstörungen sind häufig erste Symptome. Die klinischen Symptome werden mit der Skala nach Kurtzke (EDSS – expanded disability status scale) beurteilt. Diese Skala erfasst den „globalen Behinderungsgrad“ des einzelnen Patienten. Es wird zwischen 0 (Normalbefund) bis 10 (Tod durch MS) unterschieden (17). Diese Skala spielt eine große Rolle als Verlaufs- und Prognoseparameter der Multiplen Sklerose und dient der Kontrolle des Therapieerfolgs, so dass er in wissenschaftlichen Studien Verwendung findet.

Die Diagnose der Multiplen Sklerose wird auf der Basis der klinisch etablierten Diagnosekriterien nach McDonald gestellt (18;19). Der Nachweis von Entzündungsherden im ZNS ist ein Hauptkriterium für die Diagnose einer MS. Das MRT hat sich hierbei als wichtigstes diagnostisches Verfahren bei der Diagnosestellung der MS etabliert.

1.3 Pathogenese und Immunologie der Multiplen Sklerose

Die genaue Pathogenese der Multiplen Sklerose ist noch nicht hinreichend geklärt. Basierend auf Forschungen im Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) sowie auf immunologischen und radiologischen Untersuchungen, ergibt sich jedoch eine Modellvorstellung der Multiplen Sklerose.

Man geht davon aus, dass es sich bei der MS um eine T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung gegen Proteine der Myelinscheiden des Zentralen Nervensystems handelt (10). Bei allen Menschen lassen sich autoreaktive T-Zellen gegen die unterschiedlichsten körpereigenen Antigene isolieren, die zum normalen Immunsystem eines jeden Menschen gehören (20). Ein Teil der natürlicherweise vorkommenden autoreaktiven T-Zellen sind auch spezifisch gegen Antigene der Myelinscheiden des ZNS und peripherer Nerven wie z.B. MBP (Myelin-basisches protein)-, PLP (Proteolipidprotein)- oder MOG (Myelin-Oligodendrozyt-Glykoprotein)-Antigene. Über die Anzahl der autoreaktiven T-Zellen gegen diese Antigene bei Gesunden und bei MS-Patienten existieren widersprüchliche Angaben in Abhängigkeit von der verwendeten Untersuchungsmethode (21).

Man vermutet, dass es bei der MS initial zu einer direkten Aktivierung dieser autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie kommt z.B. durch „molecular mimicry“, duale T-Zell-Rezeptor (TCR)-Expression oder durch Superantigene (siehe 1.5.1) (22-24). Auch eine indirekte, unspezifische T-Zell-Aktivierung z.B. durch

proinflammatorische Zytokine im Rahmen eines peripheren Infektes wäre möglich (25).

Die aktivierten T-Zellen können durch verschiedene Mechanismen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren. Bei der Einwanderung der T-Zellen ins ZNS spielen Adhäsionsmoleküle, Metallomatrixproteinasen und Chemokine eine wichtige Rolle (26;27).

Im Gehirngewebe kommt es durch Interaktion mit lokalen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Mikroglia und Astrozyten zu einer Reaktivierung der T-Zellen. Durch die T-Zellaktivierung und -proliferation kommt es zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Diese führen auf der einen Seite zu einer Aktivierung lokaler Gliazellen aber auf der anderen Seite auch zu einer Rekrutierung weiterer Immunzellen wie den zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen (CD = Cluster of Differentiation), B-Zellen, Mastzellen und Granulozyten, die zu einer Verstärkung der initial lokalen Entzündungsreaktion beitragen. Über Mechanismen einer natürlichen Entzündungskaskade wie Komplementaktivierung, Antikörperbildung, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Eicosanoiden, Apoptose aber auch direkte Effekte von natürlichen Killerzellen (NK), toxische Effekte von Zytokinen und Verdauung von Oberflächenantigenen durch Makrophagen kommt es zu einer Zerstörung der Myelinscheiden bzw. zu einer Axonschädigung mit Axonverlust.

Eine komplikationslose lokale Entzündung ist in der Regel selbstlimitierend z.B. durch Inaktivierung der autoreaktiven Zellen durch antiinflammatorische Zytokine und Apoptose der autoreaktiven T-Zellen. Der Entstehungsmechanismus

chronischer Entzündungen hingegen ist vielfältig. Eine mögliche Rolle spielt hierbei das sog. „epitope spreading“ (20;28). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die initiale Antwort der Immunzellen auf ein Epitop eines Antigens sich später auch auf andere Epitope desselben Antigens bzw. auf andere Antigene mit ähnlichen Epitopen ausdehnen kann. Es kommt also zu Kreuzreaktionen und so führt das „epitope spreading“ zu einer Vergrößerung, Diversifizierung und letztendlich auch zu einer Chronifizierung einer Entzündung. Ein weiterer wichtiger Mechanismus bei der Entstehung chronischer Entzündungen ist die Aktivierung von ortständigen kompetenten APC wie Mikroglia und Astrozyten. Die lokale Aktivierung dieser Zellen führt zu einer Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion, auch wenn von außerhalb des ZNS keine weiteren Zellen rekrutiert werden.

Wichtig ist, dass es sich bei diesem MS-Modell um einen dynamischen Prozess handelt. Die einzelnen Zellen vermitteln unter individuell unterschiedlichen Bedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten pro- oder auch antiinflammatorische Signale.

Zudem ergaben neuere Studien und histopathologische Untersuchungen, dass sich mikroskopisch und immunhistochemisch vier verschiedene Läsionsarten der Multiplen Sklerose unterscheiden lassen (29). In allen vier Läsionsarten fanden sich T-Zellen und Makrophagen. Während in den ersten beiden Läsionsarten (I + II) primär eine Myelinschädigung nachzuweisen war, zeigte sich in dem dritten und vierten Schädigungsmuster (III + IV) vor allem eine Oligodendrozytenschädigung. In den Läsionsmustern I und II zeigte sich zudem ein Erhalt der Oligodendrozyten

mit Nachweis einer Remyelinisierung, wobei in I primär eine T-Zell-vermittelte und in II primär eine B-Zell-vermittelte Immunantwort anzunehmen ist. In den Schädigungsmustern III und IV hingegen ließ sich ein Verlust der Oligodendrozyten mit wenig Remyelinisierung feststellen, wobei nur in III eine Apoptose der Oligodendrozyten nachgewiesen werden konnte.

Diese histopathologischen Subtypen der aktiven MS-Herde waren beim einzelnen Patienten konstant, unterschieden sich allerdings interindividuell.

Entzündliche Läsionen bei der MS können folglich durch verschiedene pathologische Prozesse unterschiedlicher Ätiologie entstehen, was möglicherweise auf verschiedene MS-Unterformen hindeuten könnte. Eine Korrelation zwischen diesen histopathologischen Subtypen und dem klinischen Verlauf ließ sich jedoch nicht nachweisen.

Aufgrund dieser Komplexität der Entzündungsprozesse im ZNS bei der MS können sich therapeutische Interventionen in Abhängigkeit von Art und Zeitpunkt der Applikation sowohl positiv als auch negativ auswirken oder auch gar keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen. Außerdem unterscheidet sich das individuelle Ansprechen auf eine Therapieform von Patient zu Patient aus bisher ungeklärten Gründen. Marker, die einen bestimmten Krankheitsverlauf oder einen bestimmten MS-Subtyp ohne histopathologische Aufarbeitung von Gehirngewebe zuverlässig identifizieren können, existieren nicht. Therapieentscheidungen gestalten sich deshalb oft schwierig und können sich nur am klinischen Krankheitsverlauf orientieren.

1.4 Aktuelle Therapieformen

Die Multiple Sklerose ist nicht heilbar. Der Krankheitsverlauf kann jedoch durch unterschiedliche Immuntherapien beeinflusst werden. Aufgrund der unterschiedlichen Pathomechanismen der Verlaufsformen der Multiplen Sklerose existieren verschiedene Therapieschemata. Beim schubförmig-remittierenden Verlauf spricht man von einer immunmodulierenden Stufentherapie (Eskalationstherapie) (siehe Abb. 2).

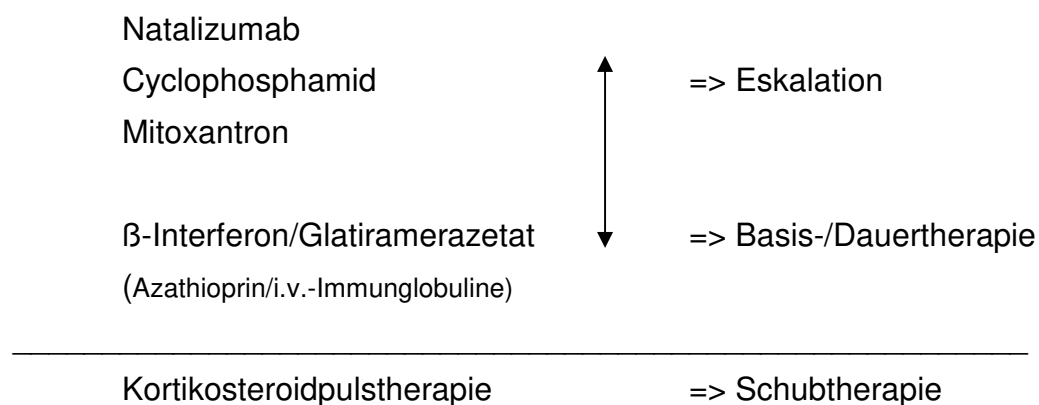


Abb. 2 Darstellung der immunmodulierenden Stufentherapie (Eskalationstherapie) bei der schubförmig-remittierend verlaufenden Multiplen Sklerose.

Die Schubbehandlung erfolgt mit einer hochdosierten Glukokortikoidpulstherapie. Glukokortikoide wirken entzündungshemmend und verhindern durch Herabsetzung der Durchlässigkeit der BHS die Einwanderung von Leukozyten in die Entzündungsherde des ZNS.

Neben dieser Schubtherapie existieren immunmodulierende (IFN- β , GA) und immunsuppressive Substanzen (Mitoxantron, Azathioprin, Cyclophosphamid) zur

Behandlung der RR-MS. Des Weiteren ist seit Kurzem der monoklonale Antikörper Natalizumab zur Eskalationsbehandlung der schubförmigen MS zugelassen.

Ziel der immunmodulierenden Basistherapie ist die Verhinderung weiterer neurologischer Defizite oder Vermeidung der Verschlechterung bestehender Ausfälle. Ergebnisse aus einzelnen Studien ergaben, dass die immunmodulatorischen Therapien insgesamt zu einer Reduktion der Schubfrequenzrate sowie Intensität einzelner Schübe und zu einer Verzögerung der Krankheitsprogression führen (30). Das Ansprechen auf diese immunmodulatorischen Behandlungsformen kann jedoch in den einzelnen Fällen nicht vorhergesagt werden. Häufig ist eine lange Behandlungsdauer notwendig, um die individuelle Wirksamkeit einer Therapie klinisch beurteilen zu können. Momentan existieren noch keine prädiktiven Marker, die eine Vorhersagbarkeit eines Therapieansprechens ermöglichen. Derzeit wird das Ansprechen auf die jeweilige Therapie anhand des klinischen Verlaufs (insbesondere mittels EDSS und Schubfrequenz) beurteilt. Zudem sind die immunmodulatorischen sowie auch die immunsuppressiven Behandlungsmethoden sehr teuer. Daher wäre es wünschenswert, prädiktive Marker zu identifizieren, die zu einem möglichst frühen Zeitpunkt ein Ansprechen auf die Therapie vorhersagen können.

1.5 Einzelne Komponenten des Immunsystems und ihre Relevanz für die Multiple Sklerose

1.5.1 Lymphozyten und Monozyten

Zu den Lymphozyten zählen die T-Zellen und B-Zellen. Die Lymphozyten sind den Leukozyten zugeordnet und sind gemeinsam an der erworbenen Immunantwort beteiligt. Während die T-Zellen hauptsächlich für die zelluläre Immunabwehr verantwortlich sind, vermitteln die B-Zellen vor allem die humorale Immunität.

T-Lymphozyten können mittels spezifischer Oberflächenmoleküle wie dem T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene erkennen. Sie erkennen jedoch nur gebundene Antigene, die mit Hilfe sogenannter Major-Histokompatibilitätskomplexe (MHC) auf der Oberfläche von APC präsentiert werden. Kernhaltige Körperzellen präsentieren Antigene auf MHC-Klasse I-Molekülen, während APC wie B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen (DC) MHC-Klasse II-Moleküle exprimieren. T-Lymphozyten werden in zwei Subpopulationen eingeteilt, den $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Sie unterscheiden vor allem dadurch, dass $CD8^+$ -T-Zellen an MHC I gebundene Antigene und $CD4^+$ T-Zellen an MHC II gebundene Antigene erkennen (31).

Zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen können defekte Körperzellen direkt mittels Initiierung einer Signalkaskade (Perforinausschüttung, Komplementaktivierung, Lyse), die zu einem programmierten Zelltod führt, eliminieren (32). Zytotoxische Zellen spielen

daher vor allem bei der Bekämpfung von viral-infizierten kernhaltigen Zellen oder Tumorzellen eine wesentliche Rolle.

CD4⁺-T-Zellen können je nach Stimulus entweder vermehrt pro-inflammatorische oder auch anti-inflammatorische Signale freisetzen und so durch Rekrutierung und Regulation weiterer Immunzellen sowohl die Entzündungsreaktion fördern als auch limitieren. Die Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen reguliert auch die humorale Immunantwort durch Stimulation der Antikörperproduktion von B-Zellen.

Bei den CD4⁺-T-Zellen werden verschiedene Subtypen unterschieden. Naive T-Zellen aus dem Thymus können sich je nach Stimulus in unterschiedliche T-Zellen-Subtypen differenzieren. Man unterscheidet Typ 1 T-Helferzellen (Th1), die vorwiegend pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon-gamma (IFN- γ), Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF- α) oder Interleukin-(IL-)2 sezernieren, von Typ 2 - Helferzellen (Th2), die anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-4, IL-5 oder IL-13 produzieren. Daneben werden noch regulatorische T-Zellen (Treg) unterschieden, deren Aufgaben in erster Linie die Limitierung einer Immunantwort gegenüber Fremdartigen und die Erhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen beinhalten. Eine weitere Subpopulation stellen die Th17-Zellen dar, die wie Th1-Zellen eine pro-inflammatorische Immunantwort durch Zytokine wie IL-17 und IL-22, IL-23 unterstützen (*Abb. 3*).

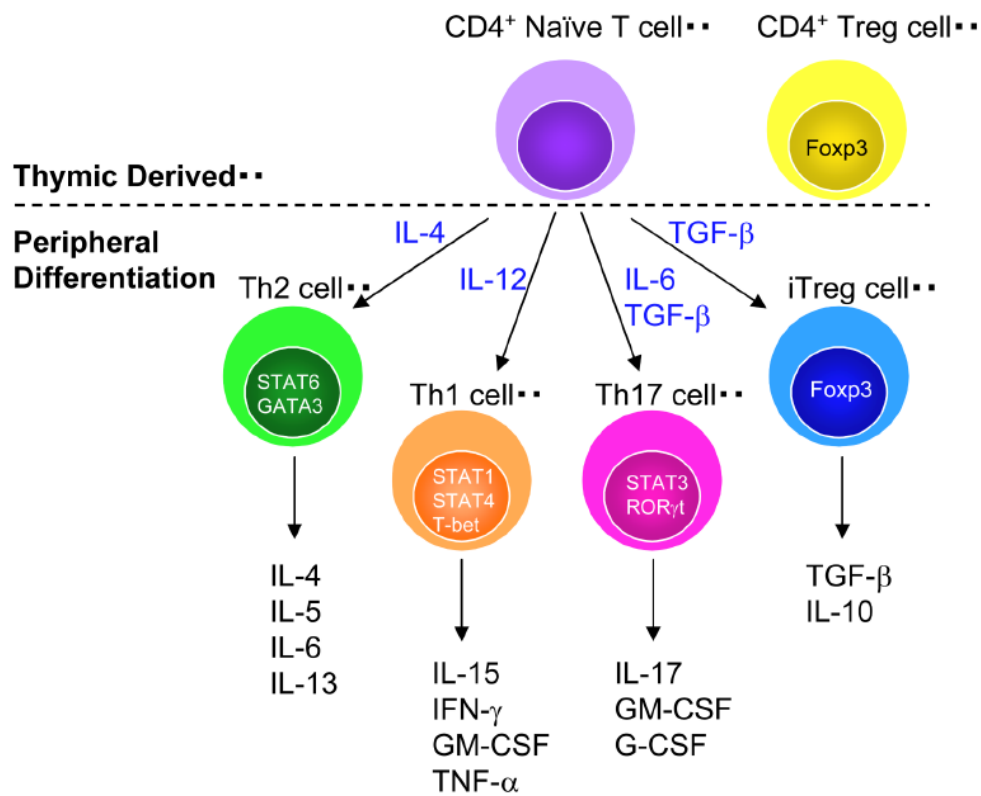


Abb. 3 Naive T-Zellen aus dem Thymus differenzieren sich je nach Stimulus in verschiedene T-Zell-Subtypen (Th1, Th2, Th17, Treg). Die regulatorischen T-Zellen (Treg) können sowohl im Thymus als auch in der Peripherie entstehen. Die einzelnen Subtypen besitzen in Abhängigkeit der produzierten Zytokine individuelle Funktionen (aus: Dittel BN. CD4⁺ T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. Brain Behav Immun. 2008 May;22(4):421-30).

Diese Subtypeneinteilung stellt wahrscheinlich eine Vereinfachung der realen Verhältnisse dar, denn es wurden z.B. auch zytotoxische CD4⁺-T-Zellen sowie CD8⁺-T-Helferzellen in der Vergangenheit beschrieben und im peripheren Gewebe sowie im Blut scheinen T-Zellen zu existieren, deren Zytokinmuster sowohl auf Th1- als auch auf Th2-Zellen zutrifft, die dann als Th0-Zellen bezeichnet werden (33).

Welche Mechanismen bei der Multiplen Sklerose zur pathologischen Aktivierung der T-Zellen führen, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Diskutiert wird beispielsweise das Modell des "Molekularen Mimikry". Dabei sollen Pathogene, die Myelin-Antigenen ähneln, zunächst in der Peripherie zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten führen. Diese aktivierten T-Zellen können dann die BHS passieren (34) und erkennen im ZNS körpereigenes Myelin als fremdes Antigen (35). Darauf folgend kommt es möglicherweise durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-2, IFN- γ , TNF- α) zu einer Initiierung einer Entzündungsreaktion mit Rekrutierung weiterer Immunzellen, Selbstaktivierung und Stimulation der humoralen Immunität.

In den Frühphasen der Läsionsbildung bei der Multiplen Sklerose ließ sich eine perivaskuläre Infiltration des Hirngewebes mit überwiegend inflammatorischen Zellen (CD4⁺, CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen) beobachten. Insbesondere in den Randbereichen von MS-Läsionen konnten CD4⁺-T-Lymphozyten mit unbekannter Spezifität nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden auch vermehrt aktivierte CD4⁺-T-Zellen, die Myelin-Antigene erkennen, im Blut von MS-Patienten gefunden (36). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von IFN- γ durch aktivierte Th1-Zellen im ZNS die Expression von HLA-Molekülen der Klasse I und II auf lokalen APC wie Astrozyten oder Mikroglia induzieren kann und es zu einer Hochregulation kosignalisierender Moleküle auf APC und CD4⁺-T-Zellen kommt (37).

Das zytotoxische Potential von CD8⁺-T-Zellen bei der MS wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht (38). Dabei wurde nachgewiesen, dass es im Gewebe

von MS-Patienten zu einer lokalen klonalen Expansion von CD8⁺-T-Lymphozyten kommen kann. Es wurde zudem gezeigt, dass diese Zelltypen über Jahre im Blut oder Liquor von MS-Patienten bestehen können und damit für die Aufrechterhaltung und auch Progredienz der Erkrankung von Bedeutung sein könnten (39).

Neben des Modells des "Molekularen Mimikry" wird angenommen, dass auch Superantigene für die Induzierung einer Immunantwort verantwortlich sein können (40). Diese in Bakterien oder Viren exprimierten, stark immunogenen Proteine binden direkt an den Komplex, bestehend aus MHC Klasse II Molekülen und CD4, und werden nicht durch APC's prozessiert (41). Andere Modelle beschäftigen sich mit relativen funktionellen Defiziten in der Ausprägung regulatorischer T-Lymphozyten sowie bei der T-Zell-Toleranz (42;43).

Auch die Aufgaben der B-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose sind vielfältig (44). Die B-Zellen gehören, wie auch die Makrophagen, zu den APC. Sie nehmen die Antigene auf, spalten diese und präsentieren die Antigenfragmente unter anderem den T-Zellen, die auf diese Weise zu einer Antigen-spezifischen T-Zellantwort aktiviert werden. Zudem differenzieren die B-Lymphozyten zu Plasmazellen und sind auf diese Weise fähig, Immunglobuline zu produzieren. Die produzierten Antikörper beeinflussen ebenfalls die T-Zell-Reaktion, es kann sowohl eine Stimulation als auch eine Suppression der T-Zellen im Rahmen des Aktivierungsprozesses erfolgen. Die B-Zellen spielen daher eine entscheidende Rolle bei der kostimulatorischen Aktivierung der T-Zellen.

Bei MS-Patienten konnte eine erhöhte intrathekale Synthese von Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM, IgD) nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei u.a. um Autoantikörper gegen verschiedene Myelin-Antigene, wie z.B. MBP, PLP oder MOG. Der Nachweis der Autoantikörper gelang in verschiedenen Materialien wie Serum, Liquor oder auch direkt im Gewebe der MS-Patienten. Darüber hinaus ließen sich erhöhte Antikörper-Titer gegen Antigene wie Bakterien, Viren, Fette oder Ganglioside feststellen (45). Die große Variabilität der Antigene weist darauf hin, dass die B-Zellen entweder polyklonal und unspezifisch aktiviert werden oder es sekundär durch Myelin-degradierende Prozesse zu einer Präsentation unterschiedlicher Antigene kommt („epitope spreading“) (46).

Autoantikörper spielen eine entscheidende Rolle bei der Myelinschädigung. Sie opsonisieren das Myelin und fördern auf diese Weise eine Zerstörung derselben durch Makrophagen. Zudem wird das Komplementsystem aktiviert und es kommt zur Zellyse. Die Autoantikörper und die entstandenen Zellfragmente haben eine chemotaktische Wirkung auf andere Immunzellen, wie die NK (s.u.), Makrophagen oder Mastzellen. Demgegenüber fördern die B-Lymphozyten den Prozess der Remyelinisierung der Nerven. Es kommt zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie Nerve Growth Factor (NGF) oder Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), die zu einer Wiederherstellung geschädigter Neurone führen. Auf diese Weise wirken die B-Zellen auch neuroprotektiv im Rahmen der Multiplen Sklerose (47).

Monozyten sind APC und gehören mit einem Durchmesser von 5-20 μm zu den größten Leukozyten. Sie machen ca. 5 % aller Leukozyten aus. Sie sind die

Vorläuferzellen von in Geweben lokalisierten Makrophagen und DC. Sie haben eine Lebensdauer von 1-3 Tagen im zirkulierenden Blut bevor sie in die Gewebe einwandern und dort ausdifferenzieren. Zu ihren Aufgaben gehören die Zerstörung körperfremder Antigene mittels Phagozytose und Aktivierung der zellulären Immunität durch Antigenpräsentation.

In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung von Makrophagen in der akuten EAE zu einer vollständigen Auslöschung klinischer Symptome führt (48). Da das Ausmaß der Demyelinisierung im Model der akuten EAE beschränkt ist, können die positiven Effekte nicht nur durch die Mithilfe der Makrophagen bei der Demyelinisierung erklärt werden, sondern vielmehr scheinen die Makrophagen einen direkten Effekt auf die axonale Funktion der Neurone zu besitzen.

Aktivierte Makrophagen werden durch Lipopolysaccharide oder IFN- γ zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-12) oder zytotoxisch wirkenden Substanzen (NO) angeregt (49). Diese aktivierten Makrophagen konnten zumindest für einen gewissen Zeitraum in MS- und EAE-Läsionen nachgewiesen werden (50-52).

Die infiltrierten Makrophagen/Monozyten führen möglicherweise durch Produktion von proinflammatorischen Mediatoren zu Axonschäden und somit zu entscheidenden Schädigungen bei der Pathophysiologie der MS.

1.5.2 Kosignalisierende Moleküle und deren Rolle bei der Multiplen Sklerose

Kosignalisierende Moleküle sind Oberflächenmoleküle z.B. auf T-Zellen oder APC (B-Zellen, Monozyten, Makrophagen etc.). Durch Bindung untereinander induzieren sie Signalkaskaden, die entweder zu stimulatorischen oder zu inhibitorischen Effekten führen. Diese Interaktion ist besonders bei der T-Zellaktivierung relevant.

Die Generierung einer effektiven Immunantwort durch T-Zellen setzt eine adäquate Stimulierung voraus, nur dann können T-Zellen ihre immunologische Wirkung entfalten. Um eine vollständige Zellaktivierung zu erreichen, benötigt die T-Zelle zwei Stimuli. Neben der Interaktion zwischen dem trimolekularen T-Zellrezeptor und den MHC-Molekülen auf APC benötigt die T-Zelle eine weitere Interaktion zwischen nicht antigen-spezifischen kosignalisierenden Molekülen auf den APC auf den T-Zellen (Abb. 4).

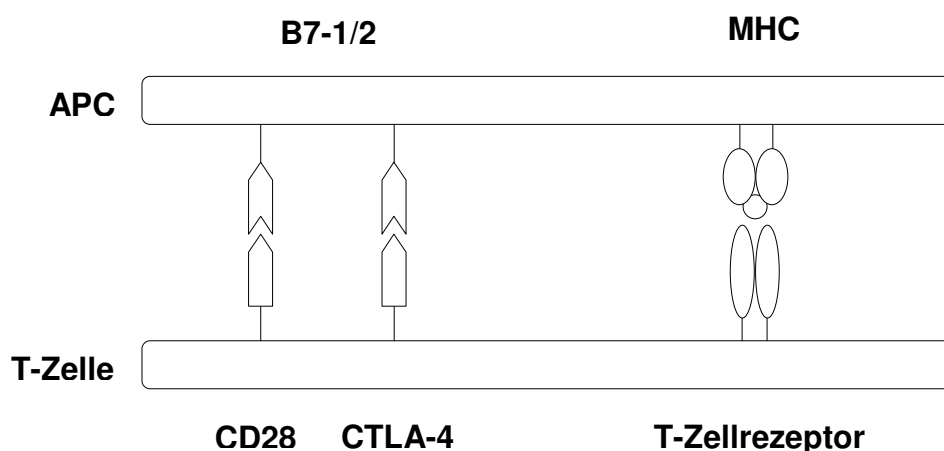


Abb. 4 Interaktion von T-Zellen mit APC über MHC und T-Zellrezeptor sowie kostimulatorische Aktivierung der T-Zelle am Beispiel der Rezeptor-Liganden-Paare der B7-Familie B7-1,2/CD28/CTLA-4.

Zu den kosignalisierenden Molekülen gehören unter anderem CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf Monozyten, die aber auch auf anderen APC wie B-Zellen und DC exprimiert werden. B7-1/2 sind Liganden sowohl für CD28 als auch für CTLA-4. CD86 wird in geringem Maße dauerhaft auf APC exprimiert und bei Zellaktivierung hochreguliert. CD80 hingegen wird ausschließlich bei Aktivierung der APC exprimiert. Ähnliche Verhältnisse lassen sich auf der T-Zelloberfläche nachweisen. CD28 wird dauerhaft exprimiert, während die Expression von CTLA-4 nur bei T-Zellaktivierung erhöht ist (53).

Die Bindung von CD28 an B7-1/2 führt zu einem positiven Signal mit Stimulierung der T-Zellaktivierung und Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-2 (54;55). Nachfolgend kommt es durch dieses zweite, kostimulatorische Signal der T-Zellaktivierung zu einem T-Zell-Shift von Th0 zu Th1 bzw. zur Proliferation von T-Helferzellen sowie zu einem längeren T-Zell-Überleben. Bei Fehlen dieser Stimulation entsteht eine unvollständige Aktivierung von T-Helferzellen, einem Stadium der T-Zell-Anergie oder dem Zelltod (56;57).

Die Bindung von CTLA-4 an B7-1/2 hingegen führt zu einem inhibitorischen Signal der T-Zellaktivierung. Die temporäre Anwesenheit des koinhibitorischen Moleküls CTLA-4 nach T-Zellaktivierung führt zu einer Terminierung der vorhandenen Immunreaktion durch Limitierung der CD28- und T-Zellrezeptor-induzierten IL-2-Produktion (58). Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass ein isoliertes Fehlen von CTLA-4 zu einer unkontrollierten lymphoproliferativen Erkrankung führen würde (59;60).

Die kosignalisierenden Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) unterscheiden sich, wie beschrieben, deutlich in ihrer Expression, Kinetik und nachgeschalteten Transduktionswegen. Diese Diversifizierung kann so weit gehen, dass diese Moleküle zu einer Polarisierung der T-Zellen in Richtung Th1 oder Th2 beitragen können (61).

In akuten MS-Plaques wurde eine vermehrte Expression von CD80 nachgewiesen, während CD86 sowohl in MS-Plaques als auch bei Kontrollen exprimiert wurde (7). Eine weitere Untersuchung konnte zeigen, dass die Expression von CD86 auf peripher zirkulierenden Monozyten bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden reduziert ist (62).

Auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zeigte sich bei der progredienten MS eine vermehrte Expression von CD80 (63). Auch während eines MS-Schubes ließ sich eine erhöhte Expression von CD80 auf B-Zellen feststellen, während unter einer IFN- β -Therapie die Anzahl an CD80-exprimierten B-Zellen reduziert war.

Wie oben beschrieben führt der CD80/CD86-CTLA4-Signalweg zu einer Limitierung bzw. Inhibierung der T-Zellaktivierung. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockierung des CD80/CD86-CD28-Signalweges mittels CTLA4Ig-Infusionen zu einer protektiven Wirkung bei der Multiplen Sklerose führt. CTLA4Ig bindet hierbei an CD80/CD86 und führt auf diese Weise zur Inhibierung (64). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis vulgaris konnte eine Behandlung mit CTLA4Ig zu einer Verbesserung des

Krankheitsverlaufs beitragen (65-67). Es wird angenommen, dass dem Wirkmechanismus vor allem eine Shift der T-Zellantwort von Th1 zu Th2 zugrunde liegt. Bereits frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Blockade des CD80/CD86-CD28-Signalweges mittels CTLA4Ig zu einer vermehrten Sekretion von Th2-Zytokinen jedoch verminderten Produktion von Th1-Zytokinen kommen kann (68;69). Umgekehrt führte die CTLA4Ig-Gabe bei Th2-vermittelten Erkrankungen auch zu einem Shift der Immunantwort zu Gunsten der Th1-Aktivierung (70) (*Abb. 5*).

Neben CTLA4 existieren weitere Oberflächenmoleküle, die inhibitorische Signale im Rahmen der T-Zellimmunantwort vermitteln. Die kosignalisierenden Moleküle PD-1, PD-L1 und PD-L2 scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung bzw. -inhibierung zu spielen. PD-1 ist ein inhibitorischer Rezeptor der B7-Familie. Er wird auf aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, auf aktivierten B-Zellen und Monozyten exprimiert und bindet an seine Liganden PD-L1 und PD-L2. Diese Liganden unterscheiden sich bezüglich ihres Expressionsortes. Während PD-L1 kontinuierlich auf hämatopoetischen Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, DC) und nicht-hämatopoetischen Zellen (endotheliale, epitheliale und Muskelzellen) exprimiert wird und bei Aktivierung hochreguliert wird, wird PD-L2 nur bei Induktion auf Makrophagen und DC exprimiert (71). Aufgrund der funktionellen und auch räumlichen Unterschiede scheinen die Oberflächenmoleküle PD-L1 und PD-L2 synergistische, jedoch auch individuell unterschiedliche Funktionen auszuüben. Durch ihr Expressionsmuster können mit

Hilfe des PD-1-PD-L1/2-Signalweges entzündliche Prozesse im peripheren Gewebe terminiert werden und so Organschäden verhindert werden (72).

Die Rolle der Liganden PD-L1 und PD-L2 ist allerdings noch umstritten. Die meisten Arbeiten deuten auf eine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung hin, so dass es bei Bindung an den PD-1-Rezeptor zu einer Hemmung der T-Zellproliferation und Zytokinproduktion kommt (73;74). Demgegenüber stehen Untersuchungen, die zeigten, dass die PD-L-Moleküle auch zu einer T-Zellaktivierung und -proliferation führen können (75;76).

Die sicher kostimulatorische Wirkung der CD80/86-CD28-Bindung und die möglicherweise inhibitorischen Effekte der PD-1-PD-L-Signalwege könnten den Grad der T-Zellaktivierung und somit die Schwelle zwischen Toleranz und Autoimmunität determinieren, insbesondere bei Expression auf nicht-hämatopoetischen Zellen in peripheren Geweben (77).

Im Vergleich zu den PD-Molekülen scheint der CD80/CD86-CTLA4-Signalweg zu einer frühen, bereits lymphoiden Inhibierung der T-Zellaktivierung während der Immunantwort zu führen. Die Aktivierung des PD-1-PD-L1/PD-L2-Signalweges spielt möglicherweise erst später im peripheren Gewebe eine wichtige Rolle, wodurch eine T-Zell-induzierten Zerstörung von Eigengewebe verhindert werden kann (78).

Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass der PD-1/PD-L-Signalweg zu einer bidirektionalen Wirkung führt. Es wird nicht nur die T-Zellaktivierung bzw. -Inhibierung beeinflusst, sondern auch die APC's selbst, auf denen sie exprimiert

werden. Insbesondere neuere Studien konnten zeigen, dass auch bidirektionale Effekte zwischen CD80 und PD-L1 bestehen (72). Neben PD-1 kann PD-L1 auch an CD80 binden und durch diese Interaktion eine inhibitorische Wirkung auf die T-Zellproliferation und Zytokinproduktion einleiten (79).

Ein weiterer wichtiger Signalweg der B7-Familie stellt die Bindung von ICOS („Inducible costimulator protein“) an seinen Liganden ICOSL dar. ICOS wird selektiv auf aktivierten T-Zellen exprimiert (80;81), insbesondere auf CD4⁺-Th2-Zellen (82). ICOSL (B7h, B7RP1) wird hingegen sowohl auf hämatopoetischen APC wie B-Zellen, Makrophagen als auch nach Stimulation mit TNF- α , auf nicht-hämatopoetischen Zellen (nicht-lymphoides Gewebe, z.B. Lunge) exprimiert (83;84). Dieser Signalweg scheint nicht für die Initiierung einer globalen T-Zellaktivierung, sondern vielmehr für die Feinjustierung bzw. Modulierung einer T-Zellimmunantwort und für die T-Zelldifferenzierung in T-Effektorzellen relevant zu sein. Die Kostimulation über diesen Signalweg führt zu einer vermehrten Produktion von Th2 Zytokinen wie IL-4 und IL-13 durch T-Effektorzellen (85). Eine Immunmodulierung mittels Sekretion dieser Zytokine scheint auch unabhängig von einer B7/CD28-Stimulation zu erfolgen (82). Neueste Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass die Interaktion zwischen ICOS und ICOSL eine nachfolgende Herunterregulierung von ICOSL erzielt. Somit scheint der kostimulatorische ICOS-ICOSL-Signalweg zu einem negativen Feedback-Mechanismus hinsichtlich der ICOSL-Expression zu führen (86).

Bei der Regulation von APC (B-Zellen, DC, Monozyten) spielt vor allem das kostimulatorische Molekül CD40 eine wichtige Rolle, welches an den Rezeptor CD154 auf aktivierten T-Zellen bindet. Dieser Signalweg gehört zur Tumornekrose-Faktor (TNF) / TNF-Rezeptor-Familie. Die Kostimulation über CD40 führt zu einer Aktivierung und Ausreifung der APC mit Steigerung der Expression von CD80 und CD86 und vermehrter Zytokinsekretion. Auf diese Weise werden weitere Immunkaskaden angestoßen sowie die Überlebenszeit der APC verlängert (87;88). Tierexperimentelle Studien bei der EAE haben zudem gezeigt, dass eine Blockade der CD40-CD154-Interaktion zu einer Reduktion der Krankheitsaktivität führt (89).

CD27 und sein Ligand CD70 gehören ebenfalls zu der TNF/TNFR-Familie. CD27 wird auf naiven T- und B- Zellen exprimiert, während CD70 auf aktivierten APC (v.a. B-Zellen) sowie auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. In einigen *in vitro* – Studien konnte gezeigt werden, dass bei Blockade der CD27-CD70-Interaktion eine Inhibierung der Proliferation und Zytokinsekretion resultiert. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass CD27 insbesondere für die frühen Zeitpunkte einer T-Zellimmunantwort relevant zu sein scheint. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die kein CD27 exprimieren, sich zwar initial nach Stimulation differenzieren, eine Proliferation jedoch erst nach drei oder mehr Tagen mit geringerer Anzahl an T-Zellen auftritt (90).

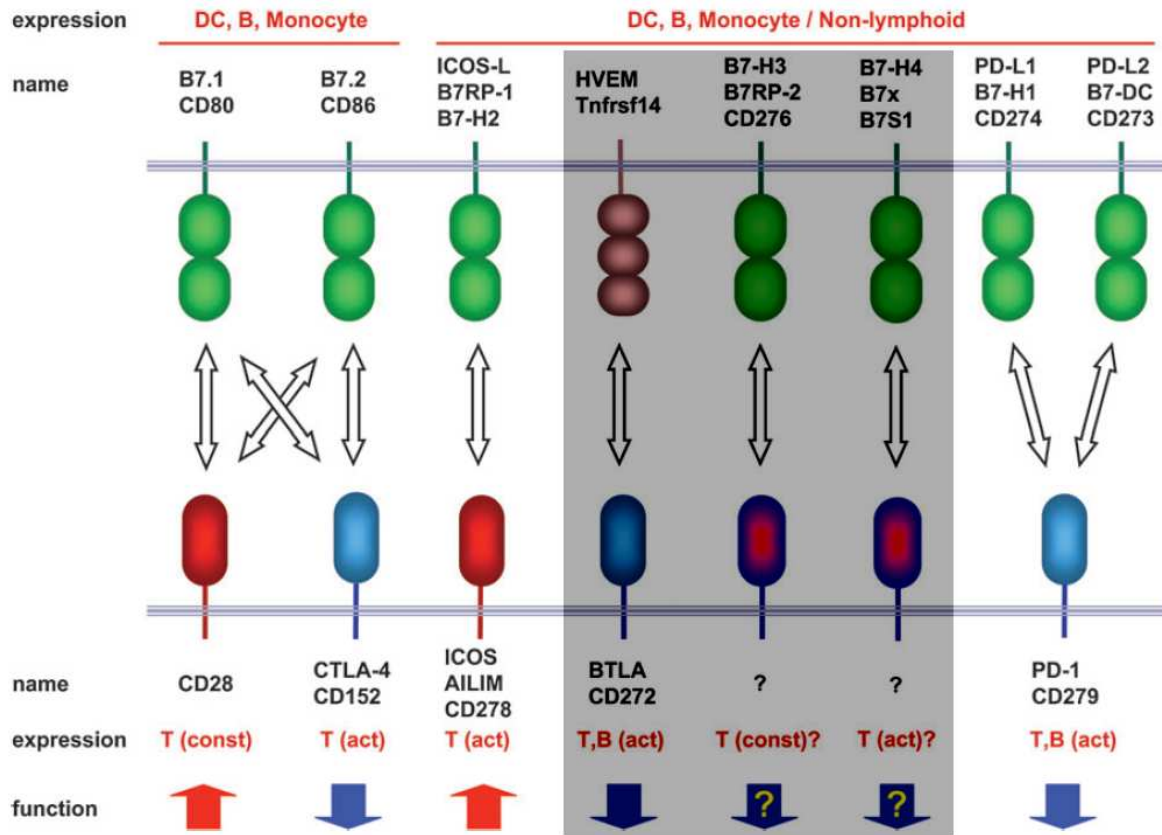


Abb. 5 Zusammenfassung der B7-Familie und deren Liganden. Bezeichnungen, Expressionsmuster und Funktionen sind dargestellt (act: Expression bei Aktivierung; const: dauerhafte Expression; grau unterlegt: Die Moleküle wurden im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Aus [modifiziert]: Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007 Jul;19(7):813-24).

Eine Auswahl an Kosignalisierenden Molekülen mit vornehmlich kostimulatorischer und koinhibitorischer Wirkung ist in folgender Tabelle beispielhaft vorgestellt:

Rezeptor	Lokalisation	Ligand	Lokalisation
B7-Familie			
ICOS	Aktivierte T-Zellen	B7h (B7RP1, ICOSL)	APC (Monozyten, B-Zellen), (nicht hämatopoet. Zellen)
CD28	T-Zellen	B7-1, B7-2	APC (Monozyten, B-Zellen, DC)
TNF-Familie			
CD27	T-Zellen, B-Zellen	CD70	aktivierte APC
CD154	aktivierte T-Zellen	CD40	APC (B-Zellen, DC, Monozyten)

Tab. 1 Kosignalisierende Moleküle mit stimulatorischer Wirkung (kostimulatorische Moleküle)

Rezeptor	Lokalisation	Ligand	Lokalisation
B7-Familie			
CTLA-4	Aktivierte T-Zellen	B7-1, B7-2	APC (Monozyten, B-Zellen, DC)
PD-1	Aktivierte T-Zellen, Aktivierte B-Zellen, Monozyten	PD-L1	hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen
PD-1	Aktivierte T-Zellen, Aktivierte B-Zellen, Monozyten	PD-L2	Monozyten, Makrophagen, DC

Tab. 2 Kosignalisierende Moleküle mit inhibitorischer Wirkung (koinhibitorische Moleküle)

1.6 Interferon-beta (IFN- β)

IFN- β gehört zu den Typ-I-Interferonen. Bei der Multiplen Sklerose sind prinzipiell zwei Subtypen des IFN- β zur Therapie zugelassen, IFN- β Ia und Ib. Während IFN- β -Ia in Säugetierzellen produziert wird, entstehen IFN- β -Ib in Bakterienzellen. Die Typ-I-Interferone haben sowohl antivirale, antiproliferative als auch immunmodulatorische Eigenschaften und unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau. *In vitro* - Untersuchungen zeigten zwar, dass bezüglich der Funktionalität Unterschiede dieser beiden Interferone existieren, hinsichtlich der Wirksamkeit bei der Behandlung der MS konnten jedoch bisher keine Unterschiede nachgewiesen werden.

IFN- β agiert über spezielle Interferon-Rezeptoren und moduliert eine Vielzahl von Immunmechanismen. So werden die Aktivierung von T-Zellen, die Adhäsion und Migration der autoreaktiven T-Zellen durch die BHS, die Zytokinsekretion und auch die Antigenpräsentation beeinflusst.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass IFN- β die T-Zellproliferation hemmt. Sowohl APC als auch T-Zellen werden durch IFN- β beeinflusst (*Abb. 6*).

Studien haben gezeigt, dass IFN- β durch Reduzierung der Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-Klasse-II-Molekülen zu einer Herabsetzung der Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung führt (91). Durch die Beeinflussung kostimulatorischer Moleküle wird eine antiinflammatorische

Reaktion der Th2-Helferzellen induziert, während eine proinflammatorische Aktivierung von Th1-Helferzellen inhibiert wird (92).

Marckmann *et al.* (2004) konnten dagegen nachweisen, dass IFN- β *in vitro* zu einer Zunahme der Expression von CD80, CD86 und CD40 auf Monozyten führt. Diese *in vitro* – Antwort ließ sich auch in unbehandelten und behandelten Patienten mit IFN- β feststellen, während eine Behandlung mit GA zu einer Abnahme der *in vitro* – Reaktion auf GA führt (93-95). Zudem wurde bei Patienten in Hautbiopsien an der Injektionsstelle des IFN- β eine Hochregulation der Expression von CD80 mRNA nachgewiesen, so dass vermutet wurde, dass IFN- β nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* eine Zunahme der Expression von CD80 bewirkt.

In einigen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass IFN- β sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 induziert (96;97). Ein Zusammenhang der vermehrten IL-10 Produktion mit der veränderten Expression kostimulatorischer Moleküle konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (98).

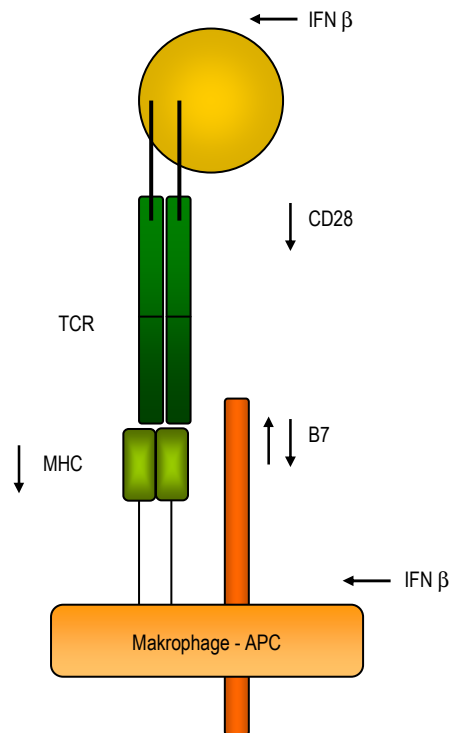


Abb. 6 Mögliche Wirkmechanismen des IFN-β auf die Antigenpräsentation. IFN-β scheint auf APC und auf seinen Rezeptor auf T-Zellen zu wirken, in dem die Expression der Moleküle verändert wird, die essentiell für eine vollständige T-Zellaktivierung sind. TCR: T-Zellrezeptor; MHC: Major Histokompatibilitätskomplex (aus [modifiziert]: Yong VW. *Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. Neurology. 2002 Sep;59(6):802-8*).

Neben der bereits frühen Hemmung der T-Zellaktivierung und Produktion proinflammatorischer Zytokine (99) scheint IFN-β auch zu einer Abnahme der Expression von Adhäsionsmolekülen, die für die Migration der autoreaktiven T-Zellen durch die BHS unabdingbar sind, zu führen (100;101).

Weitere Studien haben gezeigt, dass IFN-β zudem die Migration der T-Zellen durch die BHS hemmt, indem die IL-2-stimulierte Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9-Enzyme, die die Matrix der BHS zerstören, dosisabhängig gesenkt wird (101-103).

IFN- β hemmt sowohl die IL-2-Sekretion als auch die Expression des IL-2-Rezeptors (99). Auch viele Effekte des proinflammatorisch wirkenden IFN- γ werden durch IFN- β antagonisiert. Dies ist in soweit relevant, dass IFN- γ bei der MS die Schubfrequenz zu erhöhen scheint.

In tierexperimentellen Studien am Modell der EAE wurde zudem gezeigt, dass das Gleichgewicht zwischen den Zytokinen IL-12 und IL-10 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielt. *In vitro*-Studien belegen, dass IFN- β einerseits zu einer dosisabhängigen Senkung der Sekretion des proinflammatorisch wirkenden IL-12 und andererseits zu einer dosisabhängigen Erhöhung des antiinflammatorisch wirkenden IL-10-Spiegels führt. Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung des IL-10-Serumspiegels aber auch des IL-5-Spiegels unter einer IFN- β -Therapie nachweisen. Im Rahmen dieser Studie ließ sich zudem zeigen, dass der Serumspiegel des IL-10 signifikant mit dem klinischen Ansprechen auf eine IFN- β -Behandlung assoziiert ist, während diese Korrelation für IL-5 nicht nachgewiesen werden konnte (104).

Wie bereits erwähnt, spricht nur ein Teil der MS-Patienten auf eine Behandlung mit IFN- β , so dass es auch Therapieversager oder so genannte „Non-Responder“ gibt. Eine mögliche Erklärung für ein abnehmendes Ansprechen auf die IFN- β Behandlung ist die Bildung IFN- β -neutralisierende Antikörper, die bei einigen Patientin ab > 9 Monaten Therapie nachgewiesen werden können (105). Aber nicht bei allen Patienten, die unzureichend auf die Behandlung ansprechen, können solche IFN- β -neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden, so dass

vermutlich hierbei noch andere Mechanismen zugrunde liegen. Biomarker zur Voraussage oder auch zum Monitoring des Ansprechens auf die IFN- β Behandlung vor Einleitung oder im Verlauf der Therapie beim einzelnen Patienten existieren bisher nicht, würden jedoch eine effizientere Therapieplanung ermöglichen.

1.7 Glatiramerazetat (GA)

GA besteht aus einem heterogenen Gemisch synthetischer Polypeptide, die als Antigene fungieren. Aufgrund dessen wird eine Therapie mit GA auch als eine auf Antigenen basierende Therapie betrachtet. Es ist ein Copolymer, das die Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure, Tyrosin und Lysin enthält. Im chemischen Aufbau ähnelt es dem MBP, einer der Antigene der Myelinscheiden des zentralen und peripheren Nervensystems. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum MBP wurde es initial entwickelt, um im Tiermodell eine EAE auszulösen. Stattdessen zeigte sich jedoch eine Unterdrückung der EAE (106;107). Dieser Schutzeffekt konnte in verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen Antigenen bestätigt werden (108;109), so dass der Einsatz von GA schließlich erfolgreich bei der Behandlung der Multiplen Sklerose etabliert werden konnte. In mehreren multizentrischen klinischen Studien mit GA konnte eine Senkung der Schubfrequenz und Verzögerung der Progredienz bei Patienten mit MS nachgewiesen werden (110-113). Zudem ließ sich auch ein positiver Effekt auf die Anzahl und das Volumen der Läsionen in der Kernspintomographie feststellen

(114;115). Seit 1996 ist GA in den USA, seit 2001 auch in der EU als Medikament bei der Multiplen Sklerose zugelassen.

Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute noch unklar. Diskutiert werden eine kompetitive Hemmung des MBP an MHC Klasse II-Molekülen aufgrund von Strukturähnlichkeiten und somit auch Limitierung der T-Zell-Rezeptorbindung an MBP-reaktiven Zellen mit daraufhin verminderter Aktivierung proinflammatorischer Signale. Darüber hinaus scheint GA auch die Induktion einer systemischen Th2-Antwort sowie die Sekretion von neuroprotektiven Faktoren zu beeinflussen. Zudem zeigt GA Wirkung als „altered peptide ligand“ (APL) mit Erzeugung von Anergie sowie die sog. „bystander suppression“. Diese Mechanismen interagieren miteinander und bedingen gemeinsam die Wirkung des Glatiramerazetats.

GA kann im Sinne eines APL in der Peripherie mit dem T-Zellrezeptor von MBP-reaktiven Zellen reagieren. APL's können auf diese Weise zu einer partiellen Aktivierung führen (116). Zum einen wird ein anerner Zustand in antigenspezifischen autoreaktiven T-Zellen hervorgerufen, zum anderen wird eine veränderte T-Zellfunktion initiiert (117).

Ein als sehr relevanter Mechanismus der GA-Wirkung wird die Induktion einer systemischen Th2-Antwort betrachtet. GA induziert eine große Bandbreite an T-Zell-Antworten, da GA aus verschiedenen Antigenen (s.o.) besteht. Letztendlich führt diese Initiierung zu einem peripheren Shift im Zytokinprofil der autoreaktiven T-Zellen. In diesem Zusammenhang ließen sich in Studien zum einen eine erhöhte Induktion von IL-4 (118;119), zum anderen erhöhte Induktionen von IL-5 und IL-13 nach GA-Behandlung nachweisen (120). Wiesemann *et al.* (2001)

konnte neben einer vermehrten Expression der Zytokine IL-5 und IL-13 *in vitro* auch eine Korrelation dieser erhöhten Expression mit dem klinischen Ansprechen auf eine GA-Behandlung *in vivo* nachweisen (95). In einer longitudinalen Studie an GA-behandelten Patienten fanden sich erhöhte Serumspiegel für IL-10 und erhöhte mRNA-Level in PBMC für TGF- β und IL-4, während die mRNA-Level für TNF- α sanken (121). In CD4⁺-T-Zellen zeigte sich ein signifikanter Abfall von TNF- α , IL-2 und IFN- γ (122). Zusammengefasst scheinen ein Anstieg von antiinflammatorischen Zytokinen und die Senkung des Serumspiegels proinflammatorischer Mediatoren eine entscheidende Rolle bei der therapeutischen Wirkung des GA zu spielen, auch wenn sich hinsichtlich des Serumzytokinprofils bei MS-Patienten nach Behandlung mit GA zum Teil widersprüchliche Ergebnisse ergaben (123).

Die sog. „bystander suppression“ wird ebenfalls als einer der wichtigsten Mechanismen der therapeutischen GA-Wirkung betrachtet. Hierbei handelt es sich um die durch GA induzierte Aktivierung von Th2- Zellen in der Peripherie. Durch wiederholte Applikation von GA kommt es zu einer chronischen Aktivierung dieser Th2-Zellen mit Migration durch die BHS ins zentrale ZNS. Da GA nicht die BHS durchschreiten kann kommt es zu einer Reaktivierung dieser Zellen mittels strukturähnlicher Antigene, wie beispielsweise MBP (siehe oben). Mittels Reaktivierung der T-Lymphozyten durch Myelin-MHC-APC-Komplexe im ZNS kommt es zur Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren, die wiederum inflammatorische Aktivitäten anderer Immunzellen hemmen (124) (*Abb. 7*).

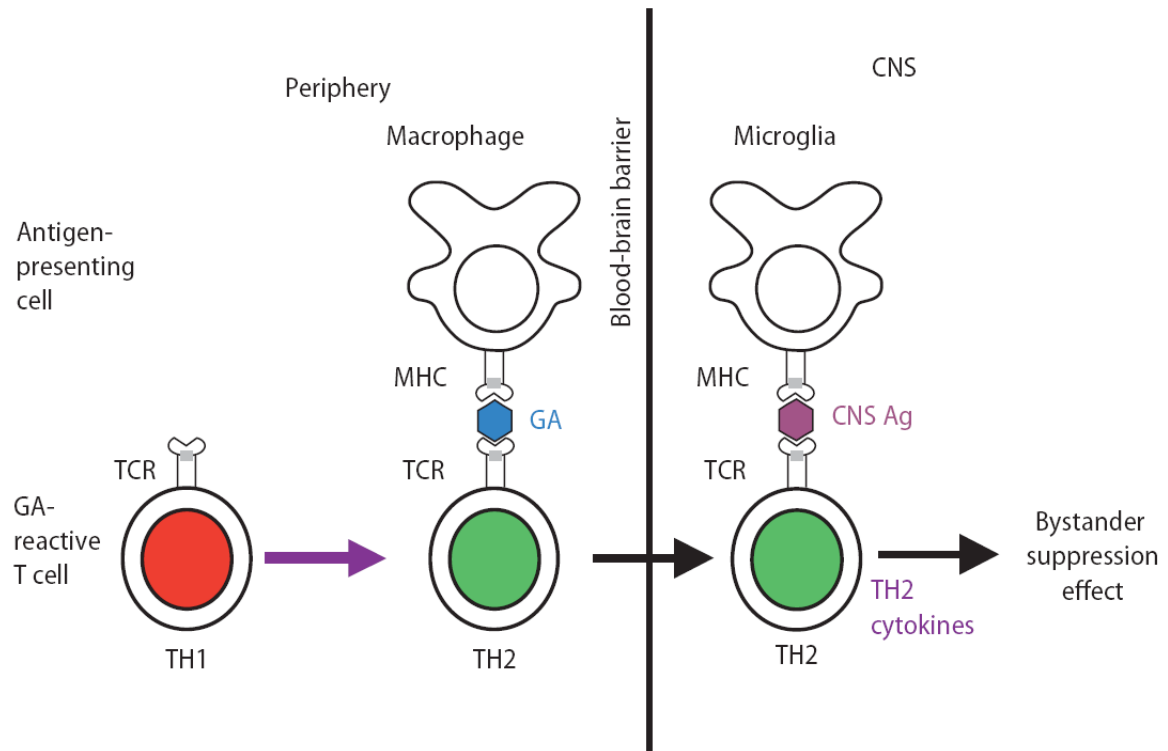


Abb. 7 Darstellung der sog. „Bystander suppression“ als möglicher Wirkmechanismus der immunmodulatorischen Therapie mit GA in Patienten mit Multipler Sklerose (aus: *Glatiramer acetate: evidence for a dual mechanism of action. J Neurol. 2008 Mar;255 Suppl 1:26-36. Review*).

Wie auch unter der Behandlung mit IFN- β oder Natalizumab kommt es während der Behandlung mit GA zur Bildung von Antikörpern, ein neutralisierender Effekt dieser Antikörper konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bedeutung kosignalisierender Signalwege bei der Multiplen Sklerose sowie deren Beeinflussung durch immunmodulierende Therapieformen näher untersucht.

Bereits in zuvor durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass kosignalisierende Moleküle eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung und damit in der Pathogenese der MS besitzen. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Immunmodulatoren Interferon- β und Glatiramerazetat direkt die kosignalisierenden Signalwege beeinflussen.

Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde der Einfluss von GA und IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten und Monozyten untersucht. Neben den direkten Effekten der beiden Substanzen auf die Expression kosignalisierender Moleküle *in vitro* wurde auch der Einfluss der Behandlung mit GA und IFN- β bei MS-Patienten auf die entsprechenden Signalwege *ex vivo* untersucht.

Die Ergebnisse wurden daraufhin in Bezug zum klinischen Ansprechen auf die jeweilige Therapie evaluiert und korreliert. Dabei wurden die Patienten nach klinischen Kriterien in sog. „Responder“ und „Non-Responder“, d.h. in Patienten, die auf die entsprechende Therapie ansprachen bzw. nicht ansprachen, unterteilt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten unter folgenden Fragestellungen:

- 1.) Nachweis direkter Effekte von IFN- β und GA auf die Expression Kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten und Monozyten *in vitro* und *ex vivo*
- 2.) Nachweis von Unterschieden in der Expression kosignalisierender Moleküle bei Patienten mit MS im Vergleich zu gesunden Kontrollen
- 3.) Korrelation der Ergebnisse aus 2.) mit dem klinischen Ansprechen von Patienten auf eine Therapie mit IFN- β und GA zur Identifikation prädiktiver Marker für die frühzeitige Vorhersage eines Therapieansprechens nach Behandlungsbeginn.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Bei dieser Studie wurden ausschließlich Patientinnen und Patienten mit MS untersucht. Als Referenz wurden gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen. Es handelte sich dabei meist um Patienten der Medizinischen Hochschule Hannover, die einmalig oder regelmäßig die MS-Ambulanz der Neurologischen Poliklinik aufsuchten. Bei all diesen Patienten bestand die Diagnose Multiple Sklerose gemäß McDonald-Kriterien. Die Durchführung der Studie wurde vorangehend von der Ethikkommission genehmigt. Vor Beginn der Untersuchungen haben die Patienten schriftlich in die Studie eingewilligt. Es wurde allen Patienten jeweils 9 ml Blut (EDTA-Röhrchen, Sarstedt) für die weiteren Untersuchungen entnommen.

Für die *ex vivo* – Studien wurden insgesamt 15 gesunde Kontrollen, 32 unbehandelte, 24 IFN- β -behandelte und 10 GA-behandelte MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf in die Untersuchung eingeschlossen. Die Geschlechtsverteilung der untersuchten Patienten, das Durchschnittsalter, das Alter der Patienten, die Dauer sowie die Schwere der Erkrankung (EDSS) sind in folgender Tabelle dargestellt (*Tab. 3*).

	gesunde Kontrollen	Unbehandelte MS-Pat.	IFN- β - behandelte MS-Pat.	GA- behandelte MS-Pat.
Gesamt	15	32	24	10
Geschlecht: weiblich	11	19	17	7
männlich	4	13	7	3
Durchschnittsalter	36,8 \pm 11,7	37,4 \pm 9,5	38,5 \pm 8,9	35,1 \pm 4,3
Altersspanne	26 - 59	21 - 58	21 - 65	30 - 43
Erkrankungsdauer	---	7,7 \pm 8,3	12,4 \pm 8,6	9,1 \pm 8,8
EDSS	---	2,0 \pm 1,0	2,0 \pm 1,0	1,6 \pm 1,5

Tab. 3 Anzahl und Einteilung der in die Studie eingeschlossenen Patienten sowie Aufteilung in Geschlecht, Alter (Jahre), Erkrankungsdauer (Jahre), klinische Beeinträchtigung (EDSS).

16 der IFN- β -behandelten MS-Patienten verabreichten jeden zweiten Tag 30 μ g Betaferon® (IFN-beta 1b, Schering) subkutan (s.c.), sechs Patienten Rebif® (IFN-beta 1a, Serono), wobei vier Patienten 22 μ g und zwei Patienten 44 μ g des Medikaments dreimal pro Woche s.c. applizierten. Weitere zwei Patienten erhielten 30 μ g Avonex® (IFN-beta 1a, Biogen Idec) einmal wöchentlich als intramuskuläre (i.m.) Injektion. Die 10 GA-behandelten Patienten injizierten täglich eine Fertigspritze in der Dosierung von 20mg/ml s.c. (Copaxone®, Teva Sanofi Aventis). Die Blutproben wurden alle innerhalb von 16-48 Stunden nach Erhalt der letzten Injektion entnommen und sofort weiterverarbeitet.

In die Querschnittsuntersuchung wurden MS-Patienten eingeschlossen, die seit mindestens 9 Monaten entweder mit IFN- β oder mit GA behandelt wurden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug die durchschnittliche Therapiedauer mit GA 2,75 \pm 2,25 Jahre (eingeschlossene Zeitspanne: neun Monate bis sieben Jahre),

die Therapie mit IFN- β $1,25 \pm 0,25$ Jahre (eingeschlossene Zeitspanne: neun Monate bis sechs Jahre). Patienten, deren Behandlungsdauer kürzer als neun Monate war, wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Keiner der unbehandelten MS-Patienten hatte sechs Monate vor Beginn der Untersuchungen eine immunmodulatorische oder immunsuppressive Therapie erhalten.

Bei 19 MS-Patienten konnte eine longitudinale Verlaufsuntersuchung durchgeführt werden, bei der Blutentnahmen bei jedem Patienten vor Therapiebeginn unter der Behandlung in regelmäßigen Abständen erfolgten. Sechs Patienten erhielten GA, 13 Patienten IFN- β (elf Patienten Betaferon®, ein Patient Rebif® und ein weiterer Patient Avonex®). Den Patienten wurde vor Therapiebeginn und alle drei Monate nach Beginn der IFN- β -bzw. GA-Therapie über ein gesamtes Jahr (Monat 0, 3, 6, 9, 12) Blut entnommen. Zudem erfolgte zeitgleich ein Monitoring bezüglich der Entwicklung der Schubfrequenz unter der Behandlung und Krankheitsprogression bzw. Schwere der Erkrankung auf der Basis von Kurtzke's EDSS. Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität vor Behandlungsbeginn wurden der EDSS und die Schubfrequenz in den letzten zwei Jahren vor Therapiebeginn herangezogen.

2.2 Responder und Non-Responder

Um eine Korrelation zwischen klinischem Ansprechen der IFN- β -Behandlung und Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle herzustellen, wurden die

MS-Patienten anhand ihres Krankheitsverlaufs in zwei Gruppen eingeteilt, zum einen in die Gruppe der „Responder“ und zum anderen in die Gruppe der „Non-Responder“. Die Patienten, bei denen eine Steigerung des EDSS um mindestens einen Punkt über drei Monate anhaltend zu verzeichnen war, oder Patienten, deren Schubintensität bzw. -frequenzrate im Vergleich zu den zwei Jahren vor Therapie unverändert blieb oder unter der Therapie anstieg, wurden als „Non-Responder“ klassifiziert. Anhand dieser Kriterien konnten insgesamt fünf von 24 IFN- β -behandelten MS-Patienten als „Non-Responder“ und 19 als sog. „Responder“ bezeichnet werden.

Auf eine derartige Analyse wurde bei GA-behandelten Patienten verzichtet, da sich keine signifikanten Effekte unter der Therapie mit GA nachweisen ließen.

2.3 Zellisolierung und -stimulation

Für die *in vitro* – Untersuchungen wurde aus 9 ml heparinisiertem venösen Blut von insgesamt sechs gesunden Probanden PBMC's mittels Dichtezentrifugation über Ficoll isoliert und daraufhin mit einer sterilen Phosphatpufferlösung (PBS; Waschlösung) gewaschen.

Die gewaschenen PBMC's wurden in Medium (RPMI 1640), unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% HEPES Puffer, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, in befeuchteter, 5% CO₂ enthaltener Luft bei 37°C über 48 Stunden in einer Polystyren 6-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden, Germany) kultiviert.

Die Zelldichte hierbei betrug nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer 1×10^6 Zellen/ml. Die Inkubation bzw. Stimulation dieses Zellgemisches erfolgte mit IFN- β (Betaferon®, Schering, Chargen-Nr. 63211-049) in einer Konzentration von 1000 U/l, da bereits in zuvor durchgeführten Studien unter dieser Konzentration der maximale Effekt beobachtet worden war (98).

Die Stimulation mit GA (Copaxone®, Teva Sanofi Aventis, Chargen-Nr. 242992997) erfolgte mit einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen.

Nach der Inkubation mit IFN- β 1b und GA über 48 Stunden wurden die PBMC's dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden je 1×10^6 Zellen in die benötigte Anzahl von Röhrchen (Falcon) verteilt und mit jeweils drei unterschiedlichen Fluorochrom-markierten Antikörpern pro Röhrchen für 15 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vor Messung in der Durchflusszytometrie erneut zweimal mit PBS gewaschen (siehe 2.4.).

Für *ex vivo* – Untersuchungen wurde jeweils 5 ml venöses Blut von MS-Patienten in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nuembrecht, Germany) entnommen. Die *ex vivo* – Untersuchungen erfolgten sofort nach Entnahme des Blutes und dienten dem Zweck, die *in vivo* – Situation mit möglichst wenigen Artefakten wiederzuspiegeln und auf diese Weise die realen Verhältnisse zu simulieren. Deshalb erfolgte die Weiterverarbeitung des Blutes für die Durchflusszytometrie innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme.

Das Blut wurde mit unsterilem FCS für 5 Minuten inkubiert, um unspezifische Fc-Rezeptor-Bindungen zu blockieren. Die Erythrozyten wurden mittels Fluorescence - activated cell sorter (FACS)-Lysis Solution nach Herstellerbeschreibung (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) lysiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/100 μ l auch hier mit Fluorochrom-markierten Antikörpern dreifach gefärbt und 15 Minuten bei Dunkelheit inkubiert (siehe 2.4.).

2.4 Durchfluss (Flow-)-Zytometrie

Der FACSCalibur (Fluorescence Activated Cell Sorter, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) arbeitet nach dem Prinzip der Durchfluss (Flow)-Zytometrie.

Bei diesem Verfahren können Einzelzellen charakterisiert werden. Die sich in Lösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Die einzelnen Zellen können durch den Laser zur Emission von Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden. Die Lichtstreuung der Zellen wird vom Gerät registriert. Dieses Streulicht ist abhängig von der Zellgröße, der Struktur der Zellwand und den intrazellulären Bestandteilen, so dass die einzelnen Zellen in Fraktionen sortiert bzw. aufgetrennt werden können.

Auf dem FACSCalibur wurden auf diese Weise die Monozyten- und Lymphozytenpopulationen durch Forward Scatter - als Maß für die Zellgröße - und Side Scatter - als Maß für die Granularität der Zelle (Größe und Struktur des

Zellkerns etc.) - bestimmt. Durch Anlegen von Gates um die entsprechende Zellpopulation konnten Monozyten und Lymphozyten getrennt gemessen werden (Abb. 8). Bei den durchgeführten *in vitro* - und *ex vivo* - Untersuchungen wurden insgesamt 10.000 Zellen im Lymphozyten- und 5.000 Zellen im Monozytengate gemessen.

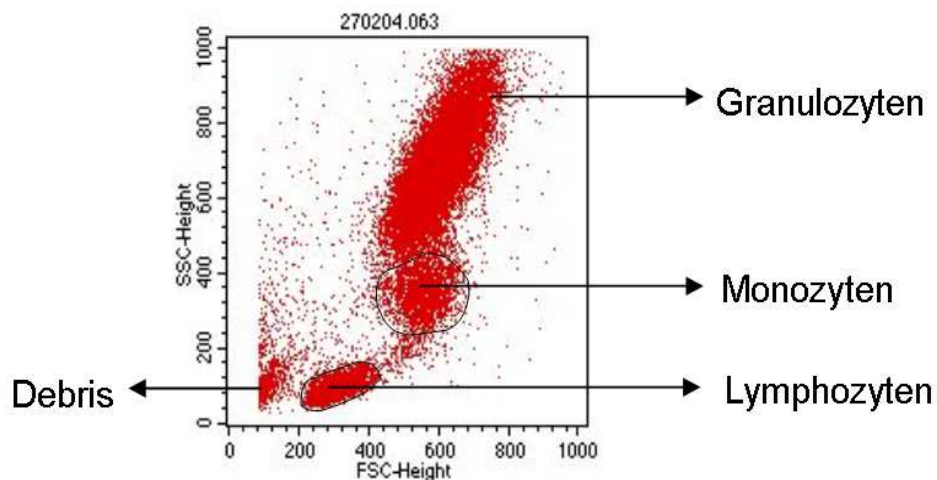


Abb. 8 Auftrennung der Zellen in einzelne Zellpopulationen auf dem FACSCalibur. Darstellung des Lymphozyten-, Monozyten- sowie des Granulozyten-Gates aus einer Vollblutprobe nach Lyse der Erythrozyten.

Bei Färbung der Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern, erfolgt zusätzlich eine Auftrennung der Zellen nach der Fluoreszenz. Es werden hierbei, nach Anregung der Zelle mit dem Laser, die entsprechenden Fluoreszenzemissionen der einzelnen Zellen registriert.

Die verwendeten Antikörper sind gegen verschiedene Oberflächenmerkmale (CD) gerichtet. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten hier die Fluorochrome FITC (Fluoresceine, Emissionsmaximum 525 nm), PE (Phycoerythrin, Emissionsmaximum 575 nm) und APC (Allophycocyanin, Emissionsmaximum 660 nm), die jeweils an die Antikörper gekoppelt sind. Die Expressionen der

kosignalisierenden Moleküle auf den unterschiedlichen Zelltypen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten) wurden durch die gleichzeitige Färbung mit den drei unterschiedlichen Fluorochromen FITC-, PE- und APC (Dreifachfärbung) bestimmt.

Für jede einzelne Färbung wurde stets ein spezifischer Antikörper für ein kosignalisierendes Molekül mit zwei Antikörpern gegen Zellpopulationsmarker kombiniert (CD4, CD8: T-Lymphozyten; CD19: B-Lymphozyten; CD14: Monozyten).

Alle auf dem FACSCalibur erfassten Informationen wurden mittels CellQuestPro Software (Becton Dickinson) analysiert und in Punktdiagrammen, den sogenannten DotPlots, oder in Histogrammen ausgewertet.

Bei den Punktdiagrammen wurde zum einen die Zellgröße (Forward Scatter) gegen die Zellgranulierung (Side Scatter) aufgetragen, um so die Monozyten- und Lymphozytenpopulationen gegeneinander abgrenzen zu können (*Abb. 8*).

Zum anderen wurden Punktdiagramme erstellt, in denen jeweils zwei Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen worden waren (*Abb. 9a*). Es wurde jeweils im Lymphozyten- und im Monozytengate gemessen.

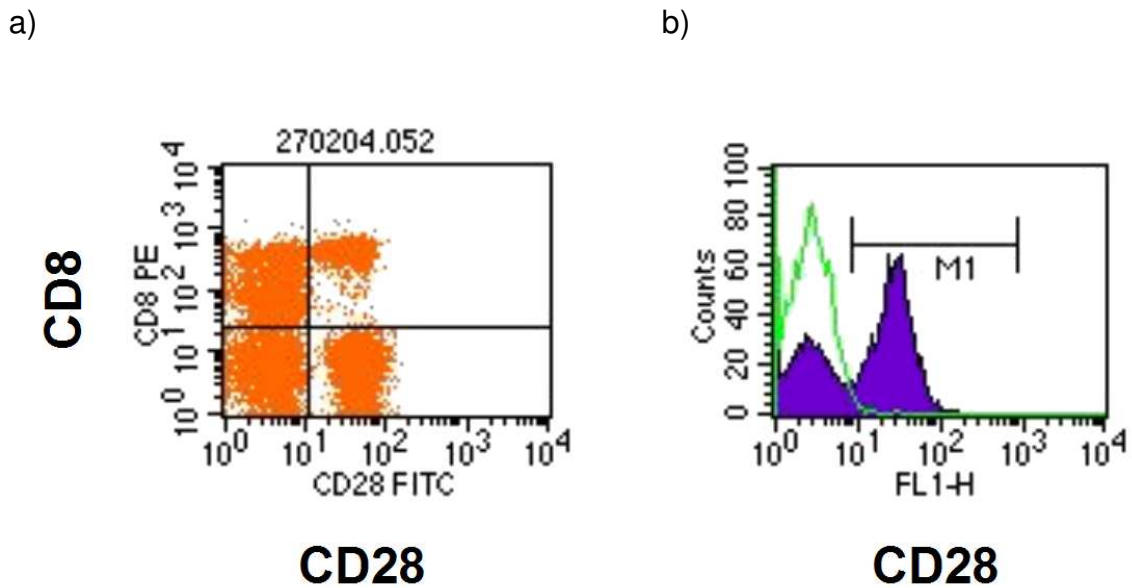


Abb. 9 Darstellung von kosignalisierenden Molekülen und Zellpopulationsmarkern als a) Punktdiagramm und als b) Histogramm auf dem FACSCalibur.

Bei den Histogrammen wurde dagegen die Zellzahl gegen die einzelnen Fluoreszenzen aufgetragen und die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (MFI) bestimmt (Abb. 9b). Um den Anteil positiver Zellen für den entsprechenden Antikörper zu bestimmen, wurde die Grenze zwischen positiven und negativen Zellen festgelegt und der Teil positiver Zellen entsprechend berechnet.

Die MFI und der Prozentanteil positiver Zellen wurden bestimmt, um unstimulierte mit IFN- β - bzw. GA-stimulierten Zellen, und unbehandelte mit IFN- β - bzw. GA-behandelten Patienten zu vergleichen.

Eine vermehrte Expression bzw. eine Änderung der Expression kosignalisierender Moleküle in MS-Patienten wurde als signifikant bezeichnet, wenn der Unterschied der Expression >5% betrug. Die verwendeten Antikörper sind in 2.7.1 aufgelistet.

2.5 Antikörper gegen IFN- β im Serum von MS-Patienten

Aus allen Blutproben von IFN- β -behandelten MS-Patienten wurde jeweils das Serum gewonnen, bei -80°C eingefroren und gelagert. Zur Bestimmung von Antikörpern gegen IFN- β wurden die Seren an das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, unter der Leitung von Prof. Dr. med. F. Boege versandt. In den Seren enthaltene Antikörper gegen IFN- β wurden mittels Enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA) bestimmt.

Die Methode der Antikörperbestimmung mittels ELISA wurde von Prof. Dr. med. B. Hemmer, wie unter Pachner *et al.* (2003) beschrieben, etabliert. Dieses Testverfahren stellt einen höchst zuverlässigen Screeningtest zur Bestimmung von IFN- β -Antikörpern im Serum IFN- β behandelter MS-Patienten dar (125).

Ob die auf diese Weise gemessenen IFN- β -Antikörper von funktioneller Relevanz sind, kann prinzipiell nur durch eine ergänzende Messung der tatsächlichen neutralisierenden Antikörper bestimmt werden. Die Messung dieser Antikörper kann durch die Bestimmung der Induktion von MxA mRNA mittels quantitativer RT-PCR 12 Stunden nach IFN- β -Gabe erfolgen (126). Da diese Untersuchung aus eingefrorenen Seren nicht möglich ist, konnte eine Bestimmung neutralisierender IFN- β -Antikörper im Rahmen der Untersuchung nicht durchgeführt werden. In den Untersuchungen von Prof. Dr. med. B. Hemmer konnte jedoch gezeigt werden, dass die mittels ELISA bestimmten Antikörpertiter gut mit der Höhe von neutralisierenden Antikörpern korrelieren (Deisenhammer,

Hemmer, Paper in Vorbereitung). Ein negatives Ergebnis im ELISA-Test schließt somit die Anwesenheit von neutralisierenden IFN- β -Antikörpern aus.

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung für den Vergleich von IFN- β /GA-stimulierten PBMCs zu unstimulierten Zellen oder den Vergleich von unbehandelten zu IFN- β /GA-behandelten Patienten erfolgte mit einem one-way ANOVA-Test. Wenn die Daten nicht normal verteilt waren wurde stattdessen der Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks Test verwendet. Der Zusammenhang zwischen erhöhter Expression kosignalisierender Moleküle unter IFN- β -Behandlung und dem Ansprechen auf die Therapie (Responder und Non-Responder) wurde mittels Chi-Square Test oder Fisher's two-tailed exact Test ermittelt. Die Anzahl der Responder und Non-Responder sowie die Anzahl der Patienten mit oder ohne Anstieg der kosignalisierenden Moleküle wurden in eine Vierfeldertafel eingetragen. Der Fisher's two-tailed exact Test wurde anstatt des Chi-Square Tests verwendet, wenn es für mindestens ein Feld weniger als fünf Patienten gab. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Annahme falsch ist, dass ein tatsächlicher Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression kosignalisierender Moleküle und dem klinischen Ansprechen auf die IFN- β -Behandlung besteht. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Für alle Tests wurde die Software von SigmaPlot 2001 (für Windows/Version 7.0) und SigmaStat 1997 (für Windows/Version 2.03) verwendet.

2.7 Verwendete Antikörper und Materialien

2.7.1 Antikörper

Es wurden ausschließlich direkt markierte Maus-Antikörper verwendet.

Oberflächenmolekül/ Antikörper	Fluoreszenz- farbstoff	Hersteller	Klon
Kontrollen			
Isotype Control IgG1	FITC	ImmunoTools	203
Isotype Control IgG1	PE	ImmunoTools	203
Isotype Control IgG2a	FITC	ImmunoTools	713
Isotype Control IgG2a	PE	ImmunoTools	713
Isotype Control IgG2b	PE	ImmunoTools	GC198
Zellpopulationsmarker			
Anti – human CD4	FITC	BD Biosciences	RPA-T4
Anti – human CD4	PE	BD Biosciences	RPA-T4
Anti – human CD4	APC	BD Biosciences	SK3
Anti – human CD8	FITC	BD Biosciences	SK1
Anti – human CD8	PE	ImmunoTools	4H8
Anti – human CD14	FITC	ImmunoTools	MEM-18
Anti – human CD14	PE	ImmunoTools	8G3
Anti – human CD19	APC	BD Biosciences	HIB19

Kosignalisierende Moleküle			
Anti – human CD27	FITC	BD Biosciences	M-T271
Anti – human CD28	FITC	BD Biosciences	RPA-T4
Anti – human CD40	FITC	BD Biosciences	5C3
Anti – human CD80	FITC	ImmunoTech	MAB104
Anti – human CD86	FITC	BD Biosciences	2331(FUN-1)
Anti – human CD154	FITC	eBiosciences	24-31
Anti – human ICOS	FITC	eBiosciences	ISA-3
Anti – human ICOSL	PE	eBiosciences	MIH12
Anti – human PD-1	FITC	eBiosciences	J116
Anti – human PD-L1	PE	eBiosciences	MIH1
Anti – human PD-L2	PE	eBiosciences	MIH18

2.7.2 Materialien

Medien, Zusätze	
steriles PBS	Biochrom AG, instamed 9,55 g/l
unsteriles PBS	Biochrom AG, instamed 9,55 g/l
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare
RPMI 1640 Medium	sterilisiert, Sigma
Hepes Buffer	sterilisiert, Sigma
L-Glutamin	sterilisiert, Sigma
Penicillin-Streptomycin	sterilisiert, Sigma (Antibiotikum)
Steriles FCS	Fetal Bovine Serum, Hy Clone
Unsteriles FCS	Fetal Bovine Serum, Hy Clone
Trypanblau	0,4 %, Sigma
FACS Lysis Solution	BD Biosciences
FACS Clean	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences

FACS Flow	BD Biosciences
Gefäße	
50 ml	sterilisiert, Cellstar, Greiner bio-one
15 ml	sterilisiert, Cellstar, Greiner bio-one
5 ml	nicht sterilisiert, Polystyrol-Rundbodenröhrchen, Falcon, BD Biosciences
Cryo.S	sterilisiert, Cellstar, Greiner bio-one
Polystyren 6-Well-Platte	Nunc
spezielle Pipetten	
Multipipette plus	Eppendorf
Pipettor	Hirschmann Laborgeräte
Geräte	
Megafuge, 20 R	Heraeus
FACSCalibur	BD Biosciences

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle *in vitro*: Hochregulation der Expression von PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten und PD-L1 auf CD4⁺-T-Zellen

Für *in vitro* - Untersuchungen wurden PBMC's von sechs gesunden Probanden verwendet, die mit Antikörpern gegen die Populationsmarker CD4, CD8, CD19 und CD14 sowie mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die kosignalisierenden Moleküle (ICOS, ICOSL, CD80, CD86, CD40, CD28, CD27, CD154, PD-1, PD-L1, PD-L2) gefärbt wurden.

3.1.1 Effekte von IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD28, CD27, CD154 und ICOS auf CD4⁺-T-Lymphozyten blieb nach Stimulation mit IFN- β über 48 Stunden unverändert. Für die Expression von PD-L1 auf CD4⁺-T-Zellen ergab sich hingegen eine signifikante Hochregulation von $15,9 \pm 5,1\%$ auf $51,6 \pm 6,9\%$ ($p = 0,006$) (Abb. 10).

Auch auf CD8⁺-T-Lymphozyten ließen sich keine Änderung der Expressionen für die kostimulatorischen Moleküle CD28, CD27 und ICOS nachweisen.

Für PD-L1 ergab sich, entgegengesetzt zu den Resultaten auf CD4⁺-T-Zellen, auf CD8⁺-T-Zellen ebenfalls kein signifikanter Unterschied unter der IFN-β-Stimulation *in vitro*. Auch die Expression des Rezeptors PD-1 zeigte auf den T-Lymphozyten keine relevanten Effekte.

Da PD-L2 nur auf APC exprimiert wird, erfolgte keine Bestimmung der Expression dieses Moleküls auf T-Zellen.

Die Expression von CD80, CD86 und CD40 auf B-Zellen änderte sich nicht nach Stimulation mit IFN-β *in vitro*.

ICOSL zeigte auf B-Zellen ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied unter der *in vitro* – Stimulation mit IFN-β (von $7,1 \pm 1,2$ % auf $6,0 \pm 1,2$ %; $p = 0,58$) (Abb. 10).

Die Expression der PD-Moleküle PD-1, PD-L1 und PD-L2 auf B-Lymphozyten war sehr gering und änderte sich nicht unter Stimulation mit IFN-β (Abb. 10, Tab. 4).

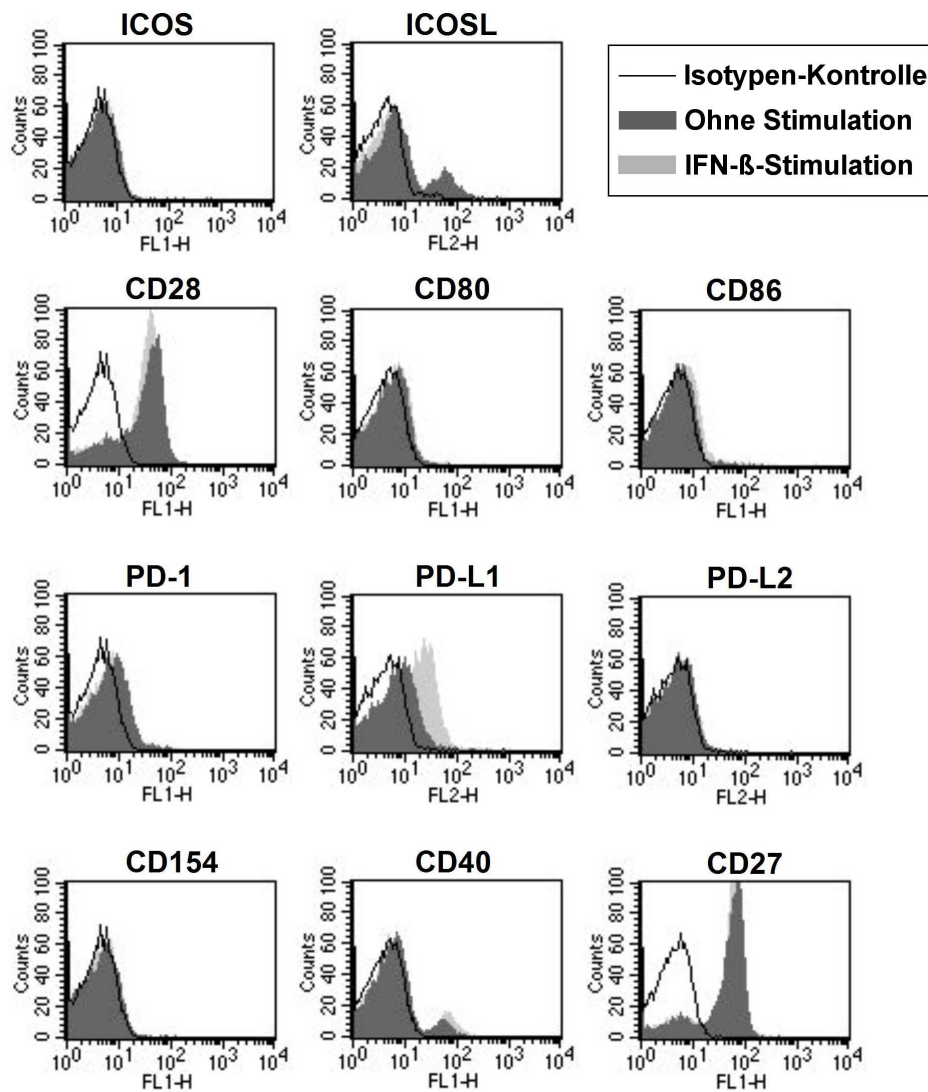
Lymphozyten

Abb. 10 Expression der Oberflächenmarker auf Lymphozyten von unstimulierten (dunkelgrau) und IFN- β -stimulierten (hellgrau) gesunden Kontrollen sowie die entsprechenden Isotypen-Kontrollen des monoklonalen Antikörpers.

3.1.2 Effekte von IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten

Bereits in Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 nach *in vitro* – Stimulation mit IFN- β signifikant zunimmt. Im Rahmen dieser Untersuchung konnten diese Resultate bestätigt werden (Abb. 11, Tab. 4) (98).

Monozyten

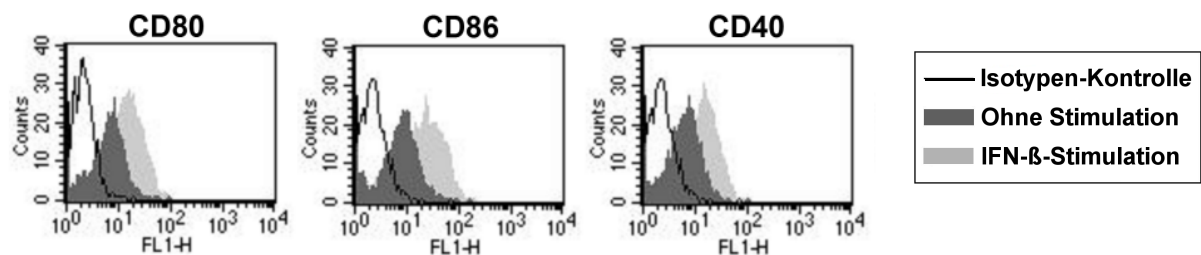


Abb. 11 Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf Monozyten von unstimulierten (dunkelgrau) und IFN- β -stimulierten (hellgrau) gesunden Kontrollen sowie die entsprechenden Isotypen-Kontrollen des monoklonalen Antikörpers.

Während die Expression des kostimulatorischen Moleküls ICOSL auf Monozyten, wie bereits auf Lymphozyten, unter der IFN- β -Stimulation keine signifikante Änderung zeigte (von $23,5 \pm 5,8$ % auf $12,0 \pm 2,9$ %; $p = 0,094$), ergab sich für PD-L1 und PD-L2 eine deutliche Hochregulation auf Monozyten. Die Expression von PD-L1 wurde von $69,8 \pm 10,8$ % auf $89,4 \pm 3,2$ % ($p = 0,01$) hochreguliert, die Expression von PD-L2 nahm von $12,5 \pm 5,2$ % auf $53,8 \pm 10,8$ % ($p = 0,001$) signifikant zu (Abb. 12).

Deren Rezeptor PD-1 dagegen zeigte eine signifikant verminderte Expression von $25,1 \pm 12,5\%$ auf $7,8 \pm 1,5\%$ auf Monozyten unter der IFN- β -Stimulation *in vitro* ($p = 0,002$).

Monozyten

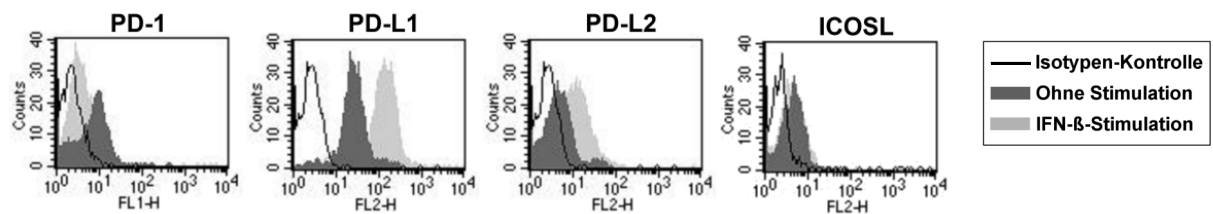


Abb. 12 Expression der PD-Moleküle und ICOSL auf Monozyten von unstimulierten (dunkelgrau) und IFN- β -stimulierten (hellgrau) gesunden Kontrollen sowie die entsprechenden Isotypen-Kontrollen des monoklonalen Antikörpers.

Im Folgenden ist die Expression der kosignalisierenden Moleküle nach IFN- β -Stimulation *in vitro* auf Lymphozyten und Monozyten tabellarisch dargestellt.

T-Lymphozyten			B-Lymphozyten			Monozyten		
Kosignal. Molekül	Unstim.	IFN- β -stim.	Kosignal. Molekül	Unstim.	IFN- β -stim.	Kosignal. Molekül	Unstim.	IFN- β -stim.
CD28:B7 Familie								
CD28/CD8	11,4 \pm 3,9	11,9 \pm 4,3	CD80/CD19	0,8 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3	CD80/CD14*	23,7 \pm 5,5	70,9 \pm 5,5
CD28/CD4	34,7 \pm 9,5	35,3 \pm 23,5	CD86/CD19	0,7 \pm 0,1	2,6 \pm 0,8	CD86/CD14*	33,0 \pm 7,3	73,3 \pm 9,7
ICOS/CD8	0,7 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	ICOSL/CD19	7,1 \pm 1,2	6,0 \pm 1,2	ICOSL/CD14	23,5 \pm 5,8	12,0 \pm 2,9
ICOS/CD4	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2						
PD-1/CD8	3,2 \pm 0,6	2,5 \pm 0,4	PD-1/CD19	1,1 \pm 0,3	1,9 \pm 0,5	PD-1/CD14*	25,1 \pm 12,5	7,8 \pm 1,5
PD-1/CD4	7,1 \pm 2,2	7,4 \pm 3,3	PD-L1/CD19	1,0 \pm 0,5	5,3 \pm 0,8	PD-L1/CD14*	69,8 \pm 10,8	89,4 \pm 3,2
PD-L1/CD4*	15,9 \pm 5,1	51,6 \pm 6,9	PD-L2/CD19	1,0 \pm 0,4	5,3 \pm 0,7	PD-L2/CD14*	12,5 \pm 5,2	53,8 \pm 10,8
PD-L1/CD8	3,2 \pm 0,2	8,3 \pm 0,7						
TNF:TNFR Familie								
CD154/CD8	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,5	CD40/CD19	7,5 \pm 1,5	8,9 \pm 2,6	CD40/CD14*	32,3 \pm 7,7	69,4 \pm 5,2
CD154/CD4	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2						
CD27/CD8	18,2 \pm 3,4	18,8 \pm 3,3						
CD27/CD4	42,6 \pm 9,0	42,2 \pm 7,9						

Tab. 4 Expression kosignalisierender Moleküle und deren Änderung unter Stimulation mit IFN- β *in vitro*. Die Expression der Marker ist in Prozent positiver Zellen angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. * = signifikante Änderung der Expression ($p < 0,05$)

3.2 Effekte der IFN- β -Therapie bei MS-Patienten: Hochregulation von CD86, CD80, CD40, PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten und von PD-L1 auf CD4⁺-T-Zellen *ex vivo*

Um festzustellen, ob die Effekte der *in vitro* - Untersuchungen auch *in vivo* nachweisbar sind, analysierten wir Blutproben von insgesamt 32 unbehandelten

MS-Patienten, 24 IFN- β -behandelten MS-Patienten und 15 gesunden Kontrollen *ex vivo*.

Zwischen der Expression kosignalisierender Moleküle bei unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (*Abb. 13*). Zwischen IFN- β -behandelten und unbehandelten MS-Patienten ließen sich hingegen deutliche Unterschiede nachweisen.

3.2.1 Effekte der Therapie mit IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten

Die Expressionen der kostimulatorischen Moleküle CD27, CD28, CD 154 und ICOS auf den T-Lymphozyten waren entsprechend den *in vitro* – Resultaten auch *ex vivo* unter der Therapie mit IFN- β nicht signifikant verändert.

Die Expression des Moleküls PD-L1 auf CD4⁺-T-Lymphozyten hingegen war, ebenfalls entsprechend den *in vitro* – Daten, in behandelten Patienten mit $31,7 \pm 1,9\%$ im Vergleich zu unbehandelten MS-Patienten mit $26,5 \pm 1,2\%$ signifikant höher ($p = 0,036$).

Auf CD8⁺-T-Zellen zeigten sich dagegen keine Unterschiede bezüglich der Expression von PD-L1 (*Abb. 13, Tab. 5*). Ähnliche Resultate ließen sich auch bei der Expression des Rezeptors PD-1 feststellen.

Vergleichbar zu den *in vitro* – Resultaten konnten auch keine relevanten Unterschiede in der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 und ICOSL *ex vivo* unter der IFN- β -Behandlung auf B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Da die PD-Moleküle PD-1 und PD-L1 auf B-Zellen kaum exprimiert werden und sich bereits *in vitro* unter einer Stimulation mit IFN- β keine Veränderung zeigte, wurde auf eine Bestimmung dieser Moleküle auf B-Lymphozyten *ex vivo* verzichtet.

3.2.2 Effekte der Therapie mit IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten

Auf Monozyten ließen sich signifikante Änderungen der Oberflächenexpression verschiedener Moleküle unter der IFN- β -Therapie nachweisen.

So zeigte sich eine Zunahme der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 von $80,1 \pm 2\%$ auf $92,1 \pm 0,6\%$ ($p < 0,001$), die Expression von CD80 nahm von $4,9 \pm 0,7\%$ auf $8,0 \pm 0,5\%$ ($p = 0,001$) und die des Moleküls CD40 von $28,1 \pm 3,9\%$ auf $40,4 \pm 3,9\%$ ($p = 0,008$) zu (*Abb. 13*).

Die Expression des kostimulatorischen Moleküls ICOSL auf Monozyten war hingegen nach IFN- β -Therapie unverändert (vergleichbar mit der *in vitro* – Untersuchung).

Die Expression der PD-Moleküle zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten MS-Patienten vergleichbar zu den *in*

in vitro - Daten. Während die Expression von PD-L1 von $61,6 \pm 4,0\%$ auf $74,6 \pm 1,9\%$ ($p = 0,002$) hochreguliert wurde, nahm die Expression von PD-L2 von $8,0 \pm 1,3\%$ auf $13,7 \pm 1,2\%$ ($p = 0,003$) unter der Therapie zu (Abb. 13).

Im Gegensatz zu den *in vitro* - Effekten blieb jedoch die Expression des PD-L1/2-Rezeptors PD-1 auf Monozyten unter einer Behandlung mit IFN- β unverändert (Abb. 13, Tab. 5).

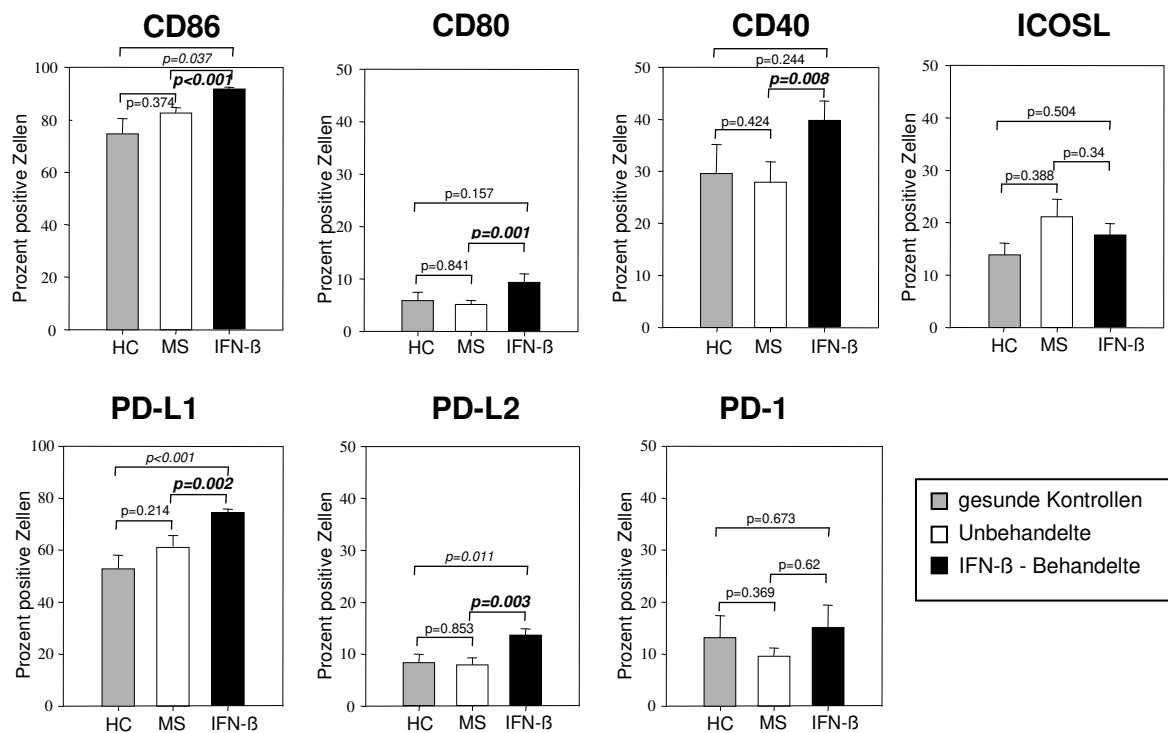


Abb. 13 Expressionen kosignalisierender Moleküle auf Monozyten von gesunden Kontrollen (HC; $n=15$), unbehandelten MS-Patienten (MS; $n=32$) sowie IFN- β -behandelten MS Patienten (IFN- β ; $n=24$). Es wurden Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt.

Im Folgenden wird die Expression der kosignalisierenden Moleküle sowie deren Änderung nach IFN- β -Therapie auf Lymphozyten und Monozyten tabellarisch dargestellt.

T-Zellen			B-Zellen			Monozyten		
kostim. Molekül	unbeh. MS-Pat.	IFN- β -beh. MS-Pat.	kostim. Molekül	unbeh. MS-Pat.	IFN- β -beh. MS-Pat.	kostim. Molekül	unbeh. MS-Pat.	IFN- β -beh. MS-Pat.
CD28:B7 Familie								
CD28/CD8	15.6 \pm 4.4	14.6 \pm 1.5	CD80/CD19	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	CD80/CD14*	4.9 \pm 0.7	8.0 \pm 0.5
CD28/CD4	47.0 \pm 2.1	48.7 \pm 1.9	CD86/CD19	0.2 \pm 0.03	0.2 \pm 0.02	CD86/CD14*	80.1 \pm 2.0	92.1 \pm 0.6
ICOS/CD8	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	ICOSL/CD19	7.0 \pm 0.8	10.0 \pm 1.5	ICOSL/CD14	21.5 \pm 4.3	17.7 \pm 2.8
ICOS/CD4	0.6 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2				PD-1/CD14	9.9 \pm 1.5	15.5 \pm 4.3
PD-1/CD8	1.5 \pm 0.3	1.7 \pm 0.3	PD-L2/CD19	0.2 \pm 0.03	0.4 \pm 0.2	PD-L1/CD14*	61.6 \pm 4.0	74.6 \pm 1.9
PD-1/CD4	0.9 \pm 0.2	1.9 \pm 0.7				PD-L2/CD14*	8.0 \pm 1.3	13.7 \pm 1.2
PD-L1/CD4*	26.5 \pm 1.2	31.7 \pm 1.9						
PD-L1/CD8	7.3 \pm 1.4	6.4 \pm 0.8						
TNF:TNFR Familie								
CD154/CD8	0.3 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	CD40/CD19	13.0 \pm 1.1	16.4 \pm 1.3	CD40/CD14*	28.1 \pm 3.9	40.4 \pm 3.9
CD154/CD4	0.1 \pm 0.02	0.3 \pm 0.06						
CD27/CD8	16.8 \pm 1.9	17.3 \pm 2.6						
CD27/CD4	44.0 \pm 2.5	47.7 \pm 3.2						

Tab. 5 Expression kosignalisierender Moleküle und deren Änderung nach Behandlung mit IFN- β *ex vivo*. Die Expression der Marker ist in Prozent positiver Zellen angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. * = signifikante Änderung der Expression ($p < 0,05$)

3.3 Zunahme der Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten korreliert mit positivem Ansprechen auf eine IFN- β -Therapie

Um einen Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle *ex vivo* und einem Ansprechen der Patienten auf die IFN- β -Therapie zu untersuchen, wurden die behandelten Patienten ($n = 24$) in zwei Gruppen eingeteilt, in Responder und Non-Responder. Anhand klinischer Kriterien (Schubintensität, Schubfrequenzrate, EDSS) konnten

19 von 24 behandelten MS-Patienten über einen definierten Zeitraum von zwei Jahren als „Responder“ klassifiziert werden (siehe 2.2). Bei diesen Patienten kam es unter der Therapie zu einer signifikanten Reduktion der Schubfrequenz und zu keiner Verschlechterung des EDSS. Fünf von 24 behandelten MS-Patienten wurden auf diese Weise zu den „Non-Respondern“ gezählt. Die Anzahl der unbehandelten MS-Patienten betrug $n = 32$. Die Anzahl der Responder und Non-Responder mit und ohne veränderter Expression der kosignalisierenden Moleküle wurden in einer Vierfeldertafel eingetragen und ein Zusammenhang der Parameter mittels Chi-Square Test oder Fisher's two-tailed exact Test ermittelt.

Bei den IFN- β -behandelten Patienten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Änderung der Expression von CD40 auf Monozyten und dem klinischen Ansprechen auf die Behandlung. Bei 17 von 19 Respondern ließ sich eine Hochregulation der Expression von CD40 auf Monozyten feststellen, wohingegen eine vermehrte Expression von CD40 auf Monozyten in der Gruppe der Non-Respondern ausblieb ($p < 0,001$, Sensitivität 84,9%, Spezifität 100%, positiver prädiktiver Wert 100%) (*Abb. 14*).

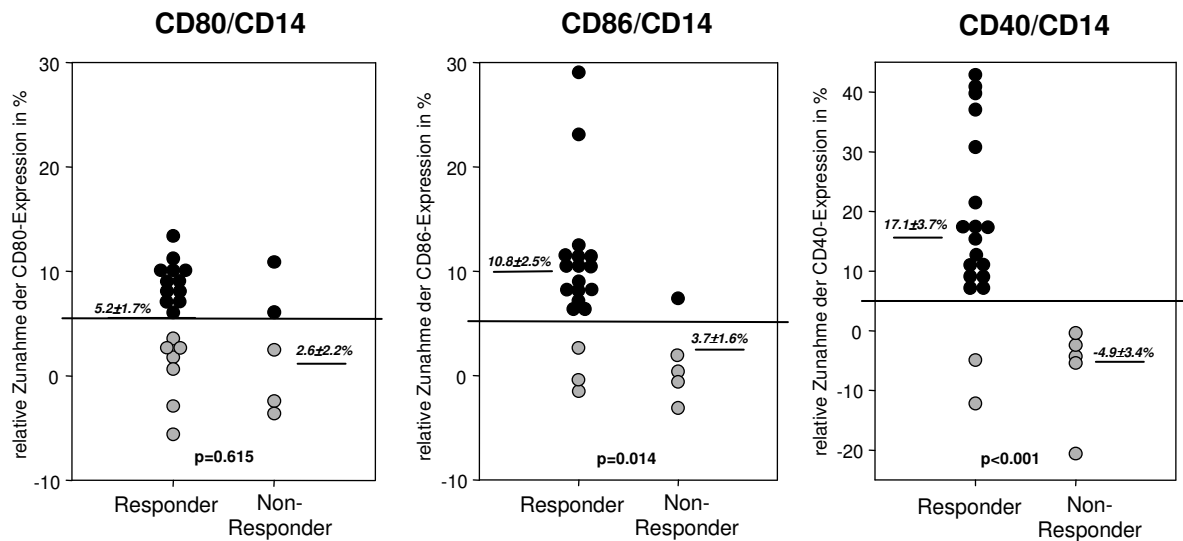


Abb. 14 Expressionsänderungen der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf Monozyten (CD14) in Relation zum klinischen Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β . Der Mittelwert der unbehandelten MS-Patienten wurde von dem Anteil positiver Zellen der IFN- β -behandelten MS-Patienten subtrahiert und als Nullpunkt definiert. Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten. Expressionänderungen wurden als signifikant gewertet, wenn der Anteil positiver Zellen mehr als 5 % betrug (schwarze Linie). Kursive Werte: Durchschnittliche/r Anstieg/Reduktion der Expression kostimulatorischer Moleküle in der Gruppe der Responder und Non-Responder.

Bei der Expression von CD86 zeigten 16 von 19 Respondern und nur einer von fünf Non-Respondern eine vermehrte Expression auf Monozyten ($p = 0,014$, Sensitivität 84,2%, Spezifität 80%, positiver prädiktiver Wert 94,1%).

Für die Hochregulation von CD80 auf Monozyten *ex vivo*, konnte kein Zusammenhang zum klinischen Ansprechen auf die IFN- β -Behandlung nachgewiesen werden: In 12 von 19 Respondern und zwei von fünf Non-Respondern zeigte sich eine erhöhte CD80-Expression auf Monozyten ($p = 0,615$) (Tab. 6).

Wie erwartet ließ sich auch keine Korrelation zwischen der ICOSL-Expression und dem klinischen Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β bei behandelten Patienten nachweisen. In 10 von 19 Respondern und drei von fünf Non-Respondern ergab sich eine verminderte Expression des kostimulatorischen ICOS-Liganden auf Monozyten ($p = 1,0$) (Tab. 6).

Bei fehlenden Effekten sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* wurde auf die Untersuchung eines Zusammenhangs des klinischen Ansprechens auf die IFN- β -Behandlung und eine veränderte Expression der Expression von CD27, CD28, CD154 und ICOS verzichtet.

Bei den Untersuchungen der PD-Moleküle war eine Analyse des Zusammenhangs des klinischen Ansprechens und der veränderten Expression nur bei 15 unbehandelten und 16 IFN- β -behandelten MS-Patienten möglich. Es ließen sich 12 Patienten in die Gruppe der Responder und 4 in die Gruppe der Non-Responder einteilen.

Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Hochregulation der Expression von PD-L2 auf Monozyten und einem Therapieansprechen auf IFN- β ($p = 0,028$, Sensitivität 83,3%, Spezifität 75%, positiver prädiktiver Wert 90,9%).

Die Hochregulation der Expression von PD-L1 auf Lymphozyten und Monozyten sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* korrelierte hingegen nicht mit einem Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β (Abb. 15).

Die Expression des PD-Rezeptors PD-1 zeigte ebenfalls keine signifikante Korrelation zum Therapieansprechen (Tab. 6).

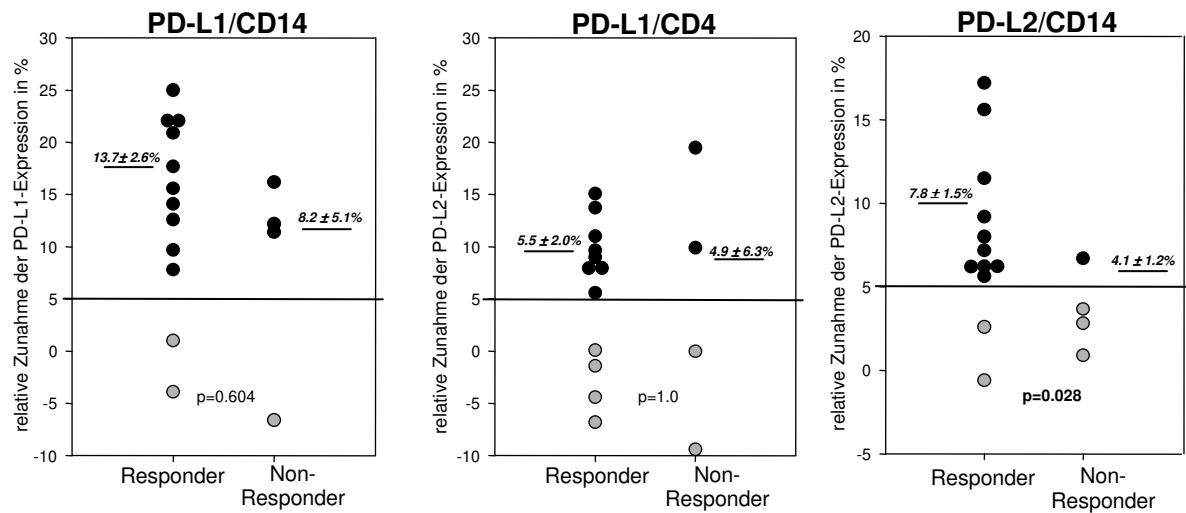


Abb. 15 Expressionsänderung der kosignalisierenden Moleküle PD-L1 auf Monozyten (CD14) und T-Lymphozyten (CD4) sowie PD-L2 auf Monozyten ($p = 0,028$) in Relation zum klinischen Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β . Der Mittelwert der unbehandelten MS-Patienten wurde von dem Anteil positiver Zellen der IFN- β -behandelten MS-Patienten subtrahiert und als Nullpunkt definiert. Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten. Expressionänderungen wurden als signifikant gewertet, wenn der Anteil positiver Zellen mehr als 5 % betrug (schwarze Linie). Kursive Werte: Durchschnittliche/r Anstieg/Reduktion der Expression koinhibitorischer Moleküle in der Gruppe der Responder und Non-Responder.

Zusammenfassend wurde bei allen Respondern auf die Therapie mit IFN- β eine Hochregulation der Expression von mindestens zwei kosignalisierenden Molekülen nachgewiesen (CD86, CD40 und/oder PD-L2), während nur zwei aus der Gruppe der Non-Responder eine vermehrte Expression von entweder CD86 oder PD-L2 zeigten ($p = 0,005$, Sensitivität 100%, Spezifität 60%, positiver prädiktiver Wert 90,5%, negativer prädiktiver Wert 100%).

In der folgenden Tabelle (Tab. 6) sind die Effekte der Stimulation mit IFN- β *in vitro* und der Therapie unter IFN- β *ex vivo* auf die Expression kosignalisierender

Moleküle auf Monozyten in Relation zum klinischen Ansprechen auf die Therapie zusammengefasst:

	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Relation zum Therapieansprechen
CD86	↑↑↑	↑↑	p = 0,014
CD80	↑↑↑	↑	p = 0,615
CD40	↑↑↑	↑↑	p < 0,001
ICOSL (B7RP1)	↔	↔	p = 1,0
PD-1	↓↓	↔	p = 1,0
PD-L1	↑↑↑	↑↑	p = 0,604
PD-L2	↑↑↑	↑	p = 0,028

Tab. 6 Anstieg/Reduktion positiver Zellen: > 5% ↑/↓, > 10% ↑↑/↓↓, > 20% ↑↑↑/↓↓↓. Keine Änderung: ↔.

3.4 Therapieansprechen ist nicht mit Antikörpern gegen IFN-β assoziiert

Zur Klärung, ob das Ansprechen auf die Therapie mit IFN-β oder die unterschiedlichen Expressionen kosignalisierender Moleküle in behandelten und unbehandelten MS-Patienten mit der Anwesenheit von Antikörpern gegen IFN-β assoziiert ist, wurde das Serum aller zuvor analysierten behandelten MS-Patienten mittels ELISA untersucht.

Lediglich in einem von fünf Non-Respondern konnte ein hoher Antikörpertiter gegen IFN-β nachgewiesen werden, die übrigen vier Patienten zeigten negative Resultate. In der Gruppe der Responder hatten drei von 19 Patienten hohe

Antikörpertiter gegen IFN- β , zwei mittelhohe und drei niedrige Titer, 11 MS-Patienten zeigten negative Ergebnisse.

Somit konnte gezeigt werden, dass ein fehlendes Ansprechen auf die Therapie nicht auf Antikörper gegen IFN- β in behandelten MS-Patienten zurückzuführen ist.

3.5 Bereits drei Monate nach Behandlungsbeginn mit IFN- β zeigen CD80, CD86 und CD40 die stärkste Hochregulation der Expression auf Monozyten

Ziel dieser longitudinalen Studie war es, den Zeitpunkt zu definieren, ab dem sich die Expression der kosignalisierenden Moleküle, die positiv mit dem Therapieansprechen korrelierten, verändern.

Bei insgesamt 13 IFN- β -behandelten MS-Patienten wurden seit Beginn der Therapie über einen Zeitraum von zwölf Monaten alle drei Monate die Expressionen der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 und ICOSL untersucht (Monat 0 (unbehandelt), 3, 6, 9, 12).

Im Folgenden sind die Expressionsänderungen der oben genannten kostimulatorischen Moleküle über ein Jahr in der Gruppe der Responder für jeden untersuchten Patienten graphisch dargestellt (*Abb. 16*):

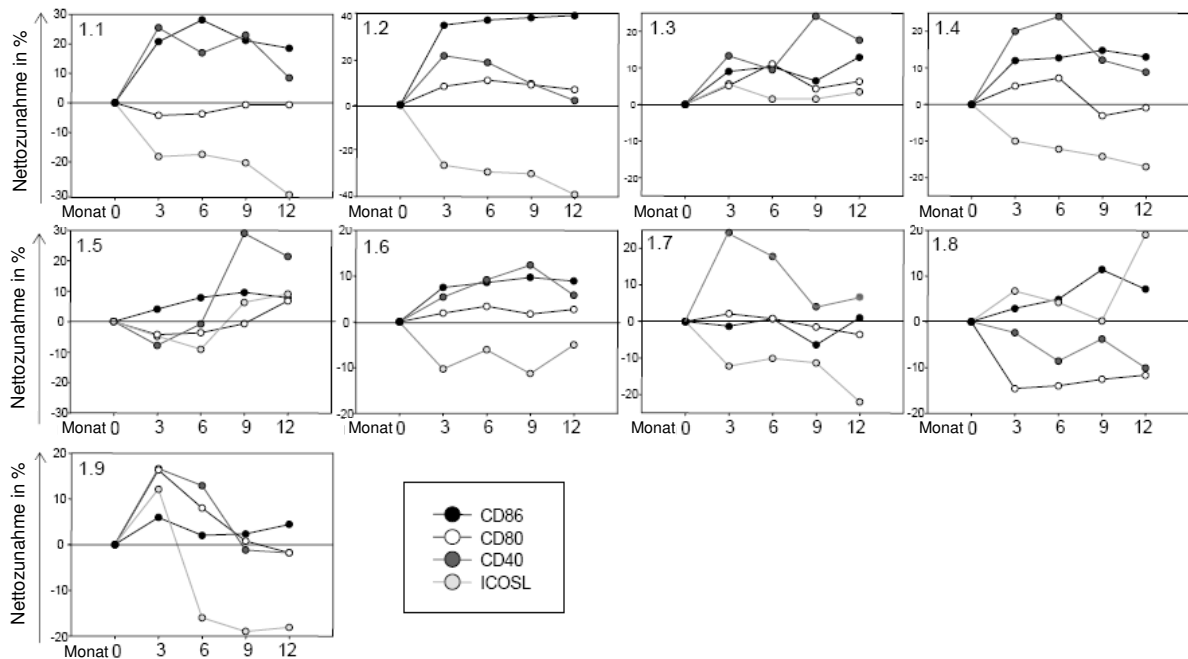


Abb. 16 Darstellung der Expressionsänderungen kostimulatorischer Moleküle über 12 Monate vor und nach Therapiebeginn mit IFN- β in der Gruppe der Responder (n = 9). Die Werte vor Initiierung der Behandlung wurden von den Werten der Monate drei bis zwölf nach Behandlungsbeginn subtrahiert und als Nullpunkt definiert.

Neun der 13 Patienten sprachen auf die Therapie mit IFN- β an. Keiner der Patienten aus dieser Gruppe der Responder (1.1 - 1.9) zeigte klinisch eine Verschlechterung, vielmehr ergab sich eine klinische Besserung mit Reduktion der Schubfrequenzrate unter der IFN- β -Behandlung.

Bei der Mehrzahl der Patienten ließ sich die stärkste Hochregulation der Expression der kosignalisierenden Moleküle CD86, CD80 und CD40 bereits drei Monate nach Therapiebeginn mit weiterer Zunahme bis Monat 9 feststellen. Während in einigen Fällen eine Abnahme der Expression zu späteren Zeitpunkten nachzuweisen war, zeigte sich insbesondere für CD86 bei den meisten

Respondern eine persistierende Erhöhung der Expression auch bis Monat 12 der Behandlung.

Vier von den 13 im Verlauf untersuchten Patienten sprachen nicht auf die Therapie an (Abb. 17).

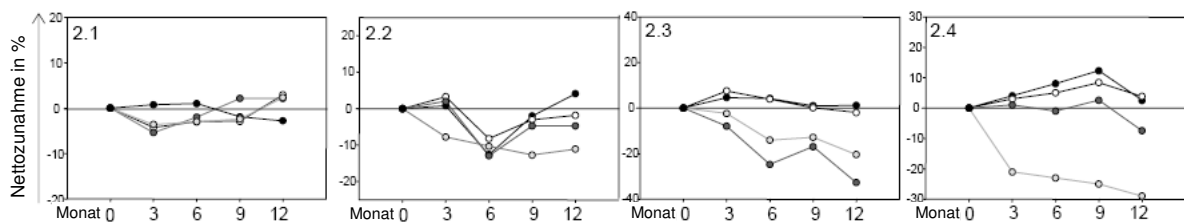


Abb. 17 Darstellung der Expressionsänderungen kostimulatorischer Moleküle über 12 Monate vor und nach Therapiebeginn in der Gruppe der Responder (n = 9). Die Werte vor Initiierung der Behandlung wurden von den Werten der Monate drei bis zwölf unter der Behandlung subtrahiert und als Nullpunkt definiert.

Bei den Patienten 2.1 und 2.2 zeigte sich eine vermehrte Schubfrequenz im Verlauf der IFN- β -Therapie im Vergleich zu zwei Jahren vor der Behandlung. Bei diesen Patienten ließ sich keine Zunahme der Expression von CD80, CD86, ICOSL und CD40 während der Therapie nachweisen.

Der Patient 2.3 hatte fünf schwere Schübe während der 15-monatigen IFN- β - Therapie. Hier zeigte sich eine unveränderte Expression der Moleküle CD80 und CD86, während eine Abnahme der Expression von ICOSL und CD40 unter der Therapie festgestellt werden konnte.

Bei dem vierten Patienten (2.4) konnte eine Hochregulation der Expression von CD80 und CD86 bis Monat 9 nachgewiesen werden, in Monat 12 wiederum eine Abnahme der Expression. Die CD40-Expression blieb bei diesem Patienten

unverändert, während die Expression von ICOSL sank. Klinisch zeigte sich eine vermehrte Schubfrequenzrate sowie drei Schübe mit stärkerer Intensität zwischen Monat sechs und 15 im Verlauf der IFN- β -Therapie.

Die PD-Moleküle konnten nur bei 4 Patienten longitudinal untersucht werden, so dass bei nicht repräsentativer Patientenzahl auf eine Darstellung verzichtet wurde.

3.6 Effekte von GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle *in vitro*: Hochregulation der Expression von CD80, CD86 und CD40 auf Monozyten

Entsprechend der Untersuchungen mit IFN- β erfolgte eine Färbung der PBMC's von sechs gesunden Probanden nach GA-Stimulation mit Populationsmarkern in Kombination mit kosignalisierenden Molekülen und eine Messung der Expression der verschiedenen Marker mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.3).

3.6.1 Effekte von GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten

Im Folgenden sind die Änderungen der Expression der kostimulatorischen Moleküle ICOS, ICOSL, CD80, CD86, CD28, CD40, CD 27, CD154 sowie der PD-

Moleküle PD-1, PD-L1, PD-L2 auf Lymphozyten unter einer *in vitro* – Stimulation mit GA tabellarisch und graphisch dargestellt.

Die Expressionen dieser kosignalisierenden Moleküle zeigten keine signifikanten Effekte auf Lymphozyten unter der Stimulation mit GA (*Abb. 18, Tab. 7*).

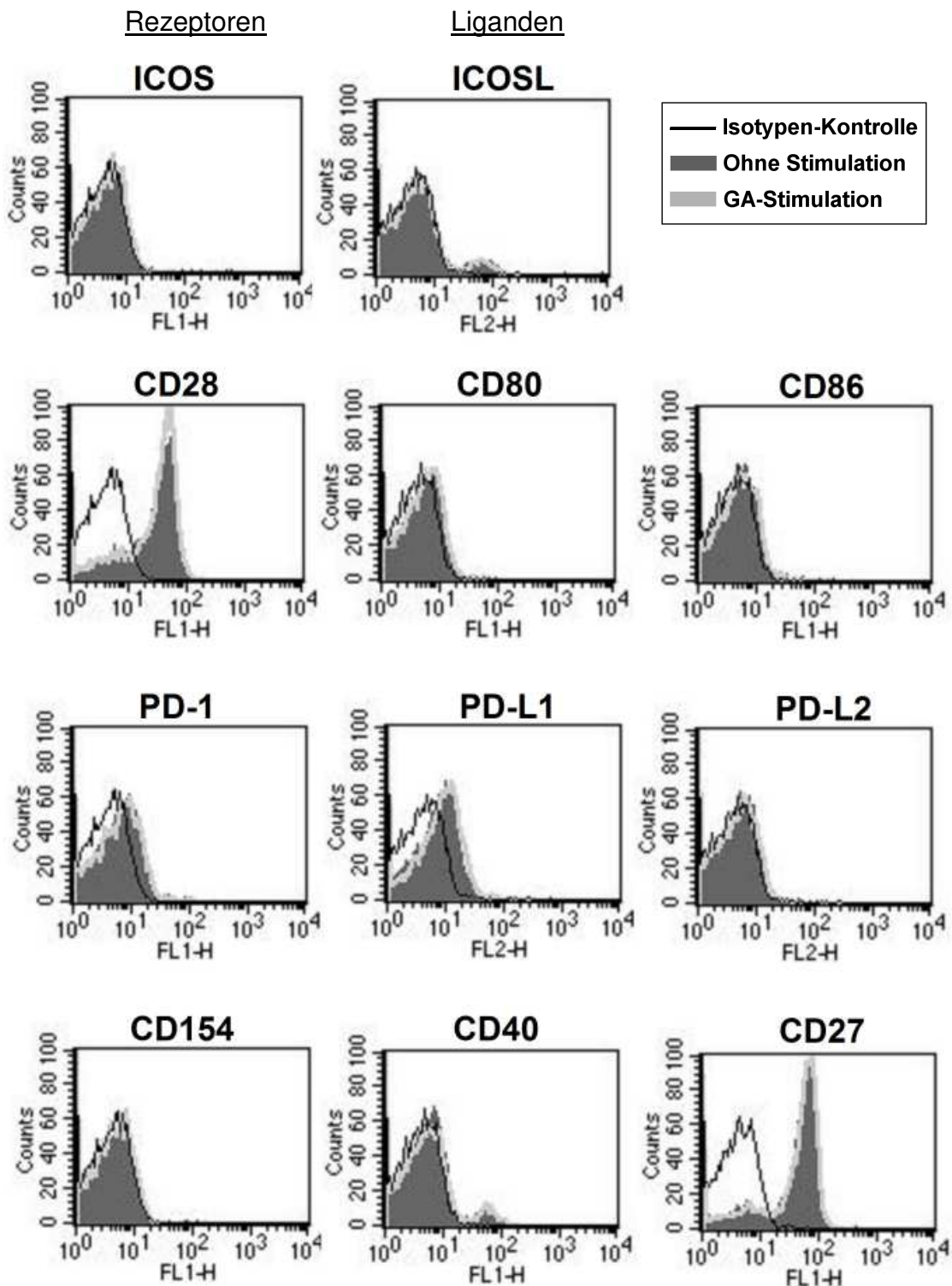


Abb. 18 Expression der Oberflächenmarker auf Lymphozyten von unstimulierten (dunkelgrau) und GA-stimulierten (hellgrau) gesunden Kontrollen sowie die entsprechenden Isotypen-Kontrollen des monoklonalen Antikörpers.

Kosignalisierendes Molekül	Änderung der Expression <i>in vitro</i>
CD28	↔
CD80	↔
CD86	↔
ICOS	↔
ICOSL	↔
PD-1	↔
PD-L1	↔
PD-L2	↔
CD40	↔
CD154	↔
CD27	↔

Tab. 7 Vereinfachte Darstellung der Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle unter einer Stimulation mit GA *in vitro* auf Lymphozyten.

3.6.2 Effekte von GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten

Entgegengesetzt zu den fehlenden Effekten auf Lymphozyten ließen sich bei der GA-Stimulation auf Monozyten *in vitro* signifikante Veränderungen der Expression von CD80, CD86 und CD40 nachweisen (Abb. 19, Tab. 8).

Während CD40 einen deutlichen Anstieg der Expression von 30% auf 50% ($p = 0,043$) zeigte, konnte bei CD80 eine vermehrte Expression von 25% auf 40% ($p =$

0,029) unter der *in vitro* – Stimulation mit GA nachgewiesen werden. Die CD86-Expression nahm von 15% auf 30% signifikant zu ($p = 0,029$) (Abb. 19).

Bei ICOSL (B7RP1) hingegen ergaben sich wie auf Lymphozyten auch auf Monozyten keine signifikanten Effekte (Abb. 19).

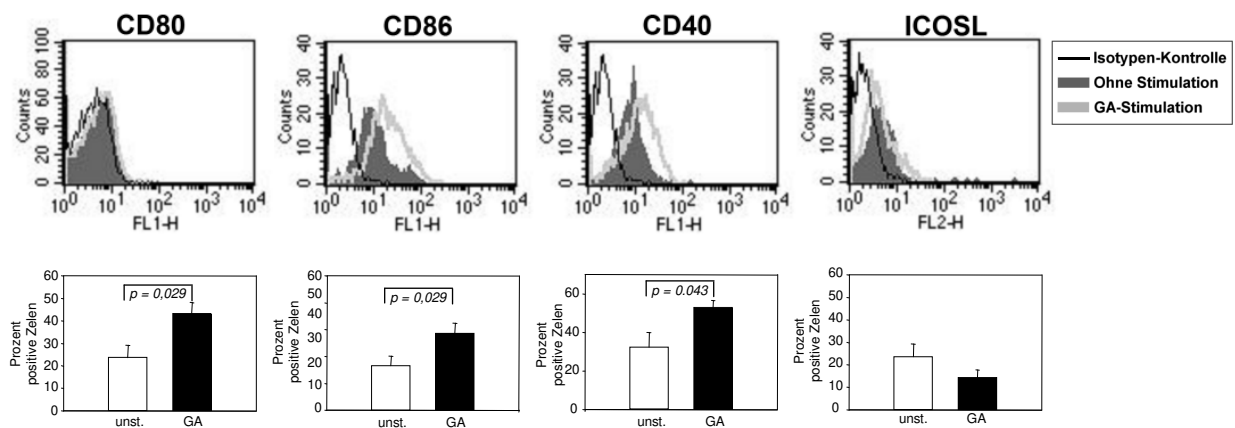


Abb. 19 Dargestellt ist die Expression der kostimulatorischen Moleküle auf Monozyten von unstimulierten (unst; Histogramm dunkelgrau, Balkendiagramm weiß) und GA-stimulierten (GA; Histogramm hellgrau, Balkendiagramm schwarz) gesunden Kontrollen sowie die entsprechenden Isotypen-Kontrollen des monoklonalen Antikörpers.

Bei der Expression der PD-Moleküle ließen sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Änderungen der Expression nachweisen (Abb. 20).

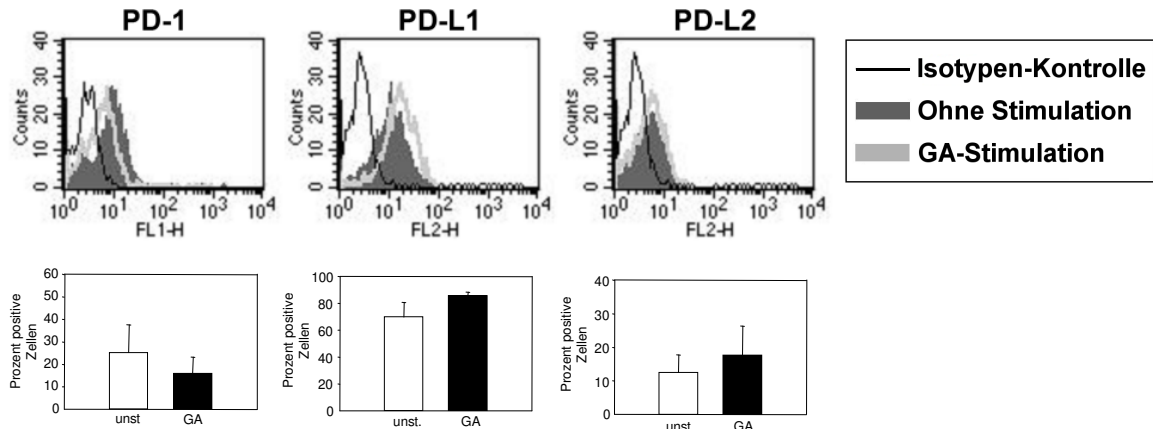


Abb. 20 Dargestellt ist die Expression der PD-Moleküle auf Monozyten von unstimulierten (unst; Histogramm dunkelgrau, Balkendiagramm weiß) und GA-stimulierten (GA; Histogramm hellgrau, Balkendiagramm schwarz) gesunden Kontrollen sowie die entsprechenden Isotypen-Kontrollen des monoklonalen Antikörpers.

Kosignalisierendes Molekül	Änderung der Expression <i>in vitro</i>
CD80	↑↑
CD86	↑↑
CD40	↑↑
ICOSL	↔
PD-1	↔
PD-L1	↔
PD-L2	↔

Tab. 8 Vereinfachte Darstellung der Änderungen der Expression Kosignalisierender Moleküle unter einer Stimulation mit GA *in vitro* auf Monozyten.

Diese Resultate stehen im Gegensatz zu den Effekten der *in vitro* – Stimulation mit IFN-β. Dort ließen sich sowohl für die hier genannten kostimulatorischen Moleküle als auch für die koinhibitorischen PD-Moleküle eine Änderungen ihrer

Expression nachweisen, während sich für die PD-Moleküle keine Änderungen unter GA-Stimulation zeigten (siehe 3.1).

3.7 Effekte der GA-Therapie bei MS-Patienten *ex vivo*: keine Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten und Monozyten

Nach einer Behandlung mit GA erfolgte ebenfalls eine Färbung des Blutes sowohl mit Populationsmarkern als auch mit kosignalisierenden Molekülen.

Die Expressionen der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40, ICOS, CD27, CD28 und CD154 wurden in insgesamt 32 unbehandelten und 10 GA-behandelten Patienten untersucht. Die Anzahl der Patienten, bei denen eine Messung der PD-Moleküle erfolgte, war mit 15 unbehandelten und fünf GA-behandelten Patienten etwas kleiner.

3.7.1 Effekte der Therapie mit GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten

Nach den fehlenden Effekten in den *in vitro* – Untersuchungen auf Lymphozyten konnten auch keine signifikanten Änderungen der Expression oben genannter kosignalisierender Moleküle unter der GA-Therapie *ex vivo* nachgewiesen werden (Tab. 9).

Kosignalisierendes Molekül	Änderung der Expression <i>ex vivo</i>
CD28	↔
CD80	↔
CD86	↔
ICOS	↔
ICOSL	↔
PD-1	↔
PD-L1	↔
PD-L2	↔
CD40	↔
CD154	↔
CD27	↔

Tab. 9 Vereinfachte Darstellung der Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle unter einer Therapie mit GA *ex vivo* auf Lymphozyten.

3.7.2 Effekte der Therapie mit GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten

Die signifikanten Änderungen der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf Monozyten unter der *in vitro* – Stimulation mit GA (siehe 3.6.2) ließen sich *ex vivo* hingegen nicht bestätigen. Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen der Expressionen.

Dies gilt ebenfalls für das kostimulatorische Molekül ICOSL als auch für die PD-Moleküle (PD-1, PD-L1, PD-L2), die bereits *in vitro* keine signifikanten Effekte gezeigt haben (Tab. 10).

Kosignalisierendes Molekül	Änderung der Expression <i>ex vivo</i>
CD80	↔
CD86	↔
CD40	↔
ICOSL	↔
PD-1	↔
PD-L1	↔
PD-L2	↔

Tab. 10 Vereinfachte Darstellung der Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle unter einer Therapie mit GA *ex vivo* auf Monozyten.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse mit den entsprechenden Standardabweichungen für unbehandelte und GA-behandelte MS-Patienten, getrennt nach T-Zellen, B-Zellen und Monozyten, dargestellt.

T-Zellen			B-Zellen			Monozyten		
kosignal.	unbeh.	GA-beh.	kosignal.	unbeh.	GA-beh.	kosignal.	unbeh.	GA-beh.
Molekül	MS-Pat.	MS-Pat.	Molekül	MS-Pat.	MS-Pat.	Molekül	MS-Pat.	MS-Pat.
CD28:B7 Familie								
CD28/CD8	15.6 ± 4.4	13.8 ± 1.9	CD80/CD19	1.2 ± 0.1	3.2 ± 2.5	CD80/CD14	4.9 ± 0.7	5.1 ± 1.2
CD28/CD4	47.0 ± 2.1	46.8 ± 4.4	CD86/CD19	0.2 ± 0.03	0.6 ± 0.3	CD86/CD14	80.1 ± 2.0	81.3 ± 3.1
ICOS/CD8	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	ICOSL/CD19	7.0 ± 0.8	6.4 ± 0.6	ICOSL/CD14	36.5 ± 4.3	18.4 ± 3.3
ICOS/CD4	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1				PD-1/CD14	9.9 ± 1.5	6.6 ± 1.4
PD-1/CD8	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.2	PD-L2/CD19	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0	PD-L1/CD14	61.6 ± 4.0	6.1 ± 0.9
PD-1/CD4	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1				PD-L2/CD14	8.0 ± 1.3	58.4 ± 4.0
PD-L1/CD4	31.7 ± 1.9	22.0 ± 2.6						
PD-L1/CD8	7.3 ± 1.4	7.1 ± 2.0						
TNF:TNFR Familie								
CD154/CD8	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	CD40/CD19	13.0 ± 1.1	11.4 ± 1.0	CD40/CD14	28.1 ± 3.9	37.2 ± 4.5
CD154/CD4	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.1						
CD27/CD8	16.8 ± 1.9	17.3 ± 2.1						
CD27/CD4	44.0 ± 2.5	45.2 ± 4.9						

Tab. 11 Es sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten und Lymphozyten in % dargestellt. Für keine der untersuchten Moleküle ergaben sich signifikante Änderungen im Vergleich der beiden Patientengruppen.

3.8 GA führt weder auf Lymphozyten noch auf Monozyten zu signifikanten Änderungen der Expressionen kosignalisierender Moleküle über die ersten zwölf Monate nach Behandlungsbeginn *in vivo*

In der longitudinalen Untersuchung wurde von sechs MS-Patienten venöses Blut alle drei Monate seit Beginn der Therapie mit GA über einen Zeitraum von zwölf Monaten entnommen. Untersucht wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 auf Monozyten und Lymphozyten (Monat 0

(unbehandelt), 3, 6, 9, 12). Die Ergebnisse der Expression auf Monozyten und Lymphozyten sind tabellarisch dargestellt (Tab. 12).

B-Zellen					
Kosignal. Molekül	0 Monate	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
CD80/CD19	1.63 ± 0.46	2.03 ± 0.50	1.38 ± 0.44	1.58 ± 0.34	1.20 ± 0.25
CD86/CD19	2.25 ± 0.10	0.43 ± 0.10	0.18 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.13 ± 0.03
CD40/CD19	14.70 ± 3.70	13.53 ± 2.93	10.70 ± 2.95	11.45 ± 1.57	11.50 ± 1.91

Monozyten					
Kosignal. Molekül	0 Monate	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
CD80/CD14	4.53 ± 1.84	5.03 ± 0.85	5.27 ± 1.16	6.35 ± 1.57	1.27 ± 0.34
CD86/CD14	85.45 ± 4.80	86.58 ± 3.55	85.604 ± 5.62	83.20 ± 2.32	63.37 ± 12.63
CD40/CD14	28.00 ± 8.85	31.95 ± 8.42	32.57 ± 6.59	38.23 ± 10.26	12.17 ± 6.48

Tab. 12 Expression der kosignalisierenden Moleküle auf Monozyten und Lymphozyten vor und unter Behandlung mit GA. Die Expression ist in Prozent der positiven Zellen als Mittelwert mit Standardfehler angegeben.

Signifikante Änderungen in der Expression kosignalisierender Moleküle nach 3, 6, 9 und 12 Monaten im Vergleich zu Monat 0 (vor Initiierung der Therapie) konnten nicht nachgewiesen werden (p-Werte nicht dargestellt).

Auf die Bestimmung der Expressionen der kostimulatorischen Moleküle CD27, CD28, CD154, ICOS, ICOSL und der PD-Moleküle wurde bei dieser Verlaufsmessung verzichtet, da bereits keine signifikanten Expressionsänderungen dieser Moleküle *in vitro* bzw. *ex vivo* nachgewiesen werden konnten (siehe 3.6 - 3.7).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der immunmodulatorischen Substanzen IFN- β und GA auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten und Lymphozyten *in vitro* und *ex vivo* untersucht. Die Änderungen der Expression dieser Moleküle wurden mit dem klinischen Ansprechen von Patienten mit Multipler Sklerose auf die immunmodulierende Therapie korreliert.

Ziel der Studie war es, einzelne prädiktive Marker zu identifizieren, die zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach Behandlungsbeginn auf ein positives oder negatives Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β und GA hinweisen.

4.1 Interferon- β

IFN- β beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen. Viele Effekte durch IFN- β auf Zellen *in vitro* und *in vivo* wurden bereits beschrieben (127-129). Die Bedeutung dieser Effekte für die therapeutische Wirksamkeit von IFN- β ist hingegen noch unklar. Nicht alle Patienten sprechen auf die Behandlung mit IFN- β an, was häufig nicht allein durch die Bildung neutralisierender Antikörper erklärt werden kann. Um klinisch beurteilen zu können, ob ein Patient auf die Behandlung mit IFN- β anspricht, ist oft ein Beobachtungszeitraum von bis zu zwei Jahren erforderlich. Daher sind prädiktive Marker, die zu einem früheren Zeitpunkt auf ein Therapieansprechen bzw. -nichtansprechen hinweisen, wünschenswert.

Kosignalisierende Moleküle kommen möglicherweise als solche Marker in Betracht, da sie eine große Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung einer autoimmunen Reaktion spielen.

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass IFN- β die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf Monozyten *in vitro* verstärkt (98) und sowohl die Reifung der DC's als auch die Expression kostimulatorischer Moleküle auf DC's beeinflusst (130). Interessanterweise zeigten unsere Untersuchungen, dass IFN- β auch die Expression der überwiegend koinhibitorisch wirkenden PD-Moleküle PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten *in vitro* verstärkt. Hingegen wird die Expression des Rezeptors dieser Moleküle PD-1 auf Monozyten runterreguliert. Diese *in vitro* - Effekte konnten im Vergleich zu unbehandelten MS-Patienten auch in Patienten mit einer IFN- β -Therapie festgestellt werden (Tab. 6). Sowohl bei der gesunden Kontrollgruppe als auch bei unbehandelten MS-Patienten zeigte die Expression dieser Moleküle keinen Unterschied. Auch korrelierte sie nicht mit der Schwere der Krankheit.

Entsprechend der Resultate der *in vitro* - Untersuchungen konnten wir neben den Effekten der Expressionen von PD-L1 und PD-L2 ebenfalls eine Zunahme der Expression von CD40, CD80 und CD86 auf Monozyten *ex vivo* bei Patienten unter einer IFN- β -Therapie nachweisen. Allerdings zeigte sich, dass nur die hochregulierten Expressionen von CD40, CD86 und PD-L2 (aber nicht von CD80 und PD-L1) auf Monozyten mit einem klinischen Ansprechen der Patienten auf eine IFN- β -Therapie korrelieren, so dass Patienten ohne eine vermehrte Expression von CD40, CD86 und/oder PD-L2 auf Monozyten sehr wahrscheinlich

nicht von einer Therapie profitieren würden (Zusammenfassung der Resultate in Tabelle 6).

Einige veröffentlichte Studien zeigten, dass IFN- β einen direkten inhibitorischen Effekt auf T-Zellen besitzt. Es kommt zu einem Rückgang der T-Zell-Proliferation und zu einer Abnahme der Sekretion proinflammatorischer Zytokine (99;131). APC's hingegen werden von IFN- β sowohl inhibiert als auch aktiviert (124).

In unserer Studie konnten wir keine Effekte von IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf T- und B-Zellen feststellen, mit Ausnahme der Zunahme der Expression des überwiegend koinhibitorisch wirkenden Moleküls PD-L1 auf CD4⁺-T-Zellen *in vitro* und *ex vivo*. Auf Monozyten hingegen werden sowohl kostimulatorische (CD40, CD80, CD86) als auch die Liganden PD-L1 und PD-L2 unter einer IFN- β -Therapie *in vitro* und *ex vivo* hochreguliert.

In zuvor veröffentlichten Studien wurden verschiedene Effekte von IFN- β auf die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Monozyten und Lymphozyten beschrieben. Einerseits konnte eine Zunahme der Expression von CD40 und CD86 auf Monozyten und eine Abnahme der Expression von CD80 auf B-Zellen während der Therapie nachgewiesen werden (92;132). Andererseits jedoch zeigten andere Studien wiederum eine reduzierte Expression von CD86 und CD154 auf Monozyten während der ersten drei Monate der IFN- β -Therapie (133). Diese Unterschiede in den Ergebnissen sind wahrscheinlich auf experimentelle Gegebenheiten zurückzuführen, da in diesen Studien mit IFN- β aktivierte Zellen *in vitro* und PBMC's analysiert wurden. Wir haben dagegen eine *ex vivo*-Analyse aus

Vollblutproben unter der Behandlung mit IFN- β durchgeführt, um die Effekte von IFN- β *in vivo* so realistisch wie möglich zu erfassen.

Über die Bedeutung des PD-1-PD-L1/PD-L2-Signalweges in der Pathogenese der Multiplen Sklerose gibt es derzeit nur wenige Informationen. Zuvor veröffentlichte Arbeiten zeigten, dass die Bindung der Liganden PD-L1 und PD-L2 an deren Rezeptor PD-1 eine Inhibierung der T-Zell-Antwort auslöst (73-75;77;134). Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im PD-1-Gen mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert ist (135). Eine andere Studie ergab, dass eine Blockade von PD-L1 auf menschlichen Monozyten und DC's zu einer Vermehrung der T-Zell-Proliferation und Th1-Zytokin-Sekretion führt. Es wurde dabei eine Zunahme der Expression von PD-L1 auf Monozyten und DC's, aber nicht auf B-Zellen nach *in vitro* - Stimulation der Zellen mit IFN- β beschrieben (136).

Entsprechend dieser Daten konnten wir ebenfalls eine Zunahme der PD-L1-Expression auf Monozyten nach *in vitro* - Stimulation mit IFN- β und auch während einer Therapie mit IFN- β bei MS-Patienten nachweisen. Wichtiger allerdings schien die Erkenntnis zu sein, dass eine Therapie mit IFN- β zu einer erhöhten Expression von PD-L2 auf Monozyten geführt hat, da diese vermehrte Expression mit einem positiven klinischen Ansprechen auf die IFN- β -Therapie assoziiert ist.

Dahingegen ließen sich keine Änderungen der Expression hinsichtlich CTLA-4 durch IFN- β nachweisen (98), so dass man schlussfolgern kann, dass IFN- β eher inhibitorische Effekte über den PD-1-PD-L1/PD-L2-Signalweg vermittelt als Effekte über den CTLA-4-CD80/CD86-Signalweg.

Um die Relevanz der Ergebnisse aus den *in vitro* - Untersuchungen zu verifizieren, teilten wir die IFN- β -behandelten MS-Patienten über einen definierten Zeitraum in zwei Gruppen ein: in Responder, die positiv auf die Therapie ansprachen, und Non-Responder, die kein Ansprechen bzw. keine positiven Effekte auf die Therapie zeigten (siehe 2.2). Keine der bisher veröffentlichten Studien beschrieb eine Korrelation zwischen den Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle unter einer IFN- β -Therapie und dem klinischen Ansprechen auf eine IFN- β -Behandlung.

Wir konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Hochregulation der Expression von CD40, CD86 und PD-L2 auf Monozyten und einem positiven klinischen Ansprechen auf die IFN- β -Therapie nachweisen ($p < 0,001$ für CD40, $p = 0,014$ für CD86, $p = 0,028$ für PD-L2, $p = 0,005$ für mindestens einen dieser drei Marker). Alle Responder zeigten eine Zunahme der Expression von mindestens zwei dieser drei Marker. Dahingegen wiesen zwei von den Non-Respondern erhöhte Expressionen von entweder CD86 oder PD-L2 auf. Dies lässt vermuten, dass ein Fehlen dieser Hochregulation in IFN- β -behandelten MS-Patienten für ein schlechtes Ansprechen auf die Behandlung spricht.

In unserer Studie wurden insgesamt 24 IFN- β behandelte MS-Patienten untersucht. Unter diesen Patienten sagte eine Hochregulation von CD40 ein positives Ansprechen auf die Therapie am besten voraus (positiver prädiktiver Wert 100%), für CD86 betrug der positive prädiktive Wert 94,1% und für PD-L2 90,9%.

Obwohl die Unterschiede zwischen Non-Respondern und Respondern sehr deutlich waren, war die Gruppe der Non-Responder klein. Um repräsentativere Ergebnisse zu erzielen, ist es deshalb wichtig, die Untersuchungen an mehr Patienten und über einen längeren Zeitraum durchzuführen.

Zudem wurden in unseren Untersuchungen die IFN- β -behandelten MS-Patienten nach ihrem Krankheitsverlauf über einen definierten Zeitraum in diese zwei Gruppen aufgeteilt. Es ist möglich, dass einige der Responder zu einem späteren Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes bzw. zu einem späteren Zeitpunkt der Therapie in die Gruppe der Non-Responder eingeordnet werden müssten.

Es gibt weitere potentielle Faktoren, die die Untersuchungsergebnisse beeinflussen können und daher bei der Interpretation der Resultate beachtet werden müssen. Im Verlauf der IFN- β -Therapie können Antikörper gegen IFN- β entstehen. Diese IFN- β -Antikörper sind meist erst nach einer mindestens neunmonatigen Therapie nachweisbar. Wir haben das Serum aller Patienten mittels ELISA auf neutralisierende, IFN- β -bindende Antikörper untersuchen lassen. Mit diesem Test konnten IFN- β Antikörper in allen Patienten mit fehlendem klinischen Ansprechen ausgeschlossen werden, so dass die beobachteten Effekte auf die Expression kosignalisierender Moleküle nicht in Zusammenhang mit der Bildung von IFN- β Antikörpern stehen.

Während die meisten Patienten IFN- β subkutan applizierten, wurden bei zwei Patienten wöchentliche intramuskuläre Injektionen verabreicht (ein Responder und ein Non-Responder). Da es bei den Untersuchungen im Verlauf der IFN- β -Therapie - unabhängig vom durchgeführten Therapiemuster - zu einer

Hochregulation der kosignalisierenden Moleküle kam, ist es unwahrscheinlich, dass das unterschiedliche Therapieregime oder die verschiedenen Plasmaspiegel des IFN- β , die auf nicht-standardisierte Zeiten der Stichprobenerhebung zurückzuführen sind, unsere Ergebnisse negativ beeinflussen oder verzerren.

In unserer Studie konnten die größten Effekte von IFN- β auf die Expression kosignalisierender Moleküle auf Monozyten nachgewiesen werden, mit Ausnahme einer zusätzlichen Zunahme der Expression von PD-L1 auf CD4⁺-T-Zellen *in vitro* und *ex vivo*. Eine Expression von PD-L2 findet sich ausschließlich auf APC's wie z.B. Monozyten, Makrophagen und DC's, wohingegen PD-L1, neben APC's und aktivierten CD4⁺-T-Zellen, auch auf verschiedenen peripheren Geweben und hämatopoetischen Zellen nachweisbar ist (75). Die Bedeutung der Expression von PD-L1 auf T-Zellen ist noch unklar, aber es wurde in anderen Studien angedeutet, dass diese Expression relevant für den Vorgang der Apoptose von T-Zellen sein kann (137). Da auch eine vermehrte Expression von PD-L1 auf Monozyten unter der Therapie festgestellt wurde, ist dies möglicherweise auch relevant für die Vermittlung des therapeutischen Effekts von IFN- β . Allerdings konnten wir in unserer Studie keine Korrelation zwischen der Expression von PD-L1 und einem (positiven) klinischen Ansprechen auf die IFN- β -Therapie nachweisen.

Eine hochregulierte Expression von PD-L2 auf Monozyten unter der IFN- β -Therapie führt ebenfalls zu einer Hemmung der T-Zell-Funktion. Dieser Effekt hingegen korrelierte in unserer Studie mit dem klinischen Ansprechen der MS-Patienten auf eine IFN- β -Therapie. Dies könnte darauf hindeuten, dass die

erhöhte Expression von PD-L2 auf Monozyten relevant ist für den therapeutischen Effekte von IFN- β . In anderen Arbeiten ergaben sich Hinweise darauf, dass PD-L1 und PD-L2 möglicherweise nicht nur inhibitorische Signale über PD-1 vermitteln, sondern auch stimulatorische Effekte über einen bisher noch unbekanntem Rezeptor (76;138).

Insgesamt ist der Wirkmechanismus von IFN- β bei der Multiplen Sklerose sehr komplex. Wahrscheinlich gehören Änderungen der Expression kosignalisierender Moleküle zu den Wirkmechanismen. Es scheinen hierbei sowohl eine Zunahme der stimulatorischen als auch der überwiegend inhibitorischen Signale eine Rolle zu spielen, so dass IFN- β möglicherweise das Gleichgewicht zwischen der Expression kostimulatorischer und koinhibitorischer Moleküle reguliert.

Da sich eine veränderte Expression der kosignalisierenden Moleküle vor allem auf Monozyten zeigte, ist anzunehmen, dass IFN- β nicht nur direkt auf T-Zellen wirkt, sondern auch indirekt die T-Zell-Antwort durch Veränderung der stimulatorischen Funktionen der APC's beeinflusst.

Bisher wurden wenige Studien veröffentlicht, die sich mit der Korrelation immunmodulatorischer Effekte von IFN- β und dem klinischen Ansprechen der Patienten auf die IFN- β -Therapie beschäftigt haben (139-152). Derartige Studien sind sehr wichtig, um relevante prädiktive Marker zu finden, die zu frühen Zeitpunkten im Verlauf einer IFN- β -Therapie bei der Multiplen Sklerose sowohl ein fehlendes als auch ein positives klinisches Ansprechen auf die Therapie vorhersagen können. Die Effekte von IFN- β auf die Expression kosignalisierender

Moleküle war schon nach drei Monaten unter Therapie nachweisbar (siehe 3.5) (153). Zuvor veröffentlichte Studien wie auch unsere Studie zeigen, dass es unwahrscheinlich ist, nur einen einzelnen Biomarker zu finden. Es sind vielmehr einige dieser Marker bzw. eine Kombination solcher prädiktiven Marker notwendig, um den diagnostischen Wert dieser zu steigern. Für die klinische Praxis ist es von Bedeutung eine Gruppe von Markern zu finden, die sich kostengünstig und leicht erfassen lassen, beispielsweise mittels FACS oder ELISA. Kosignalisierende Moleküle wie auch Zytokine (z.B. IL-10) sind hier vielversprechende Kandidaten.

Es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um herauszufinden, welche und welche Kombination von Markern am besten mit einem klinischen Ansprechen auf eine IFN- β -Therapie korrelieren und dies auch langfristig vorhersagen können.

4.2 Glatiramerazetat

Im Rahmen der *in vitro* – Untersuchungen konnte auf Lymphozyten keine signifikante Veränderung der Expression kosignalisierender Moleküle unter der GA-Stimulation festgestellt werden, während auf Monozyten eine deutliche Hochregulation der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 beobachtet wurde (siehe 3.6).

Die bei uns nachgewiesenen *in vitro* – Effekte unter einer GA-Stimulation ließen sich jedoch *ex vivo* nicht bestätigen (siehe 3.7). Die kostimulatorischen Moleküle

CD80, CD86 und CD40 zeigten unter einer GA-Therapie keine signifikante Änderung ihrer Expression.

Die longitudinale Studie im Zeitverlauf über ein Jahr unter der Behandlung mit GA zeigte ebenfalls keine signifikanten Effekte bezüglich der Expression kosignalisierender Moleküle. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die bereits genannten kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 betrachtet, da die Expression dieser Moleküle zumindest *in vitro* signifikante Effekte ergaben. Auf eine Untersuchung anderer Oberflächenmoleküle wurde dabei verzichtet, da sich sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* keine Effekte gezeigt hatten.

Diese Diskrepanz zwischen den *in vitro* – und *ex vivo* – Resultaten könnte darauf zurückzuführen sein, dass GA subkutan appliziert wird und somit eine systemische Wirkung auf Monozyten und auch auf Lymphozyten mit Veränderung der Expression kosignalisierender Moleküle möglicherweise ausbleibt. Residente DC, wie die Langerhans-Zellen, treten möglicherweise als erste mit der Substanz in Kontakt oder nehmen diese auf, um über weitere Kaskaden zum systemischen therapeutischen Effekt zu führen. Eine Untersuchung der Langerhans-Zellen erfolgte im Rahmen dieser Studie nicht, da hierzu stets eine Hautbiopsie an der Injektionsstelle notwendig gewesen wäre und diese für klinische Tests nicht gut geeignet ist.

Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Konzentration des GA, die *in vitro* zu Veränderungen der Expression kosignalisierender Moleküle geführt hat, nicht der Konzentration des GA *in vivo* entspricht. Bisher gibt es keine Daten darüber, welche Konzentration des GA tatsächlich im Kreislauf eines behandelten

Patienten vorliegt, so dass eine möglicherweise zu geringe Konzentration des GA im Kreislauf nicht zu Veränderungen der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle führt.

Einige vorhergehende Arbeiten konnten zeigen, dass kosignalisierende Moleküle auf APC's, neben deren essentieller Funktion einer vollständigen T-Zellaktivierung, auch einen Einfluss auf die Differenzierung einer T-Zelle in Richtung Th1 oder Th2 ausüben können (154). Die Induktion eines Shifts im Zytokinprofil der autoreaktiven T-Zellen durch GA in der Funktion als APL (siehe 1.7) scheint zu einem vorherrschenden Th2-Profil der antigen-spezifischen T-Zellen zu führen (116). Auch in GA-behandelten Patienten ließ sich unter einer Therapie mit GA ein Th2-dominierendes Zytokinprofil nachweisen (gemessen als Induktion von IL-4) (118;119). Es konnte gezeigt werden, dass GA APC *in vitro* dahingehend beeinflusst, dass sie weniger inflammatorische, jedoch mehr antiinflammatorische Zytokine produzieren (155). Auf diese Weise könnte der Krankheitsprogression entgegen gewirkt werden.

Ein direkter Zusammenhang zwischen einem Shift im Zytokinprofil der autoreaktiven T-Zellen und Änderungen der Expression kosignalsierender Moleküle unter GA ist in Anbetracht unserer Ergebnisse nicht erkennbar. Denn im Rahmen unserer Untersuchungen ließen sich zwar signifikante Veränderungen bezüglich der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 *in vitro*, jedoch nicht *ex vivo* nachweisen (s.o.).

Somit scheint der therapeutische Effekt des GA unabhängig von der Expression kosignalisierender Moleküle auf Lymphozyten und Monozyten vermittelt zu werden und es ist anzunehmen, dass andere Mechanismen und Kaskaden für den therapeutischen Effekt des GA verantwortlich sind.

5. Zusammenfassung

IFN- β und GA sind klinisch etablierte immunmodulierende Substanzen, die zur Therapie der Multiplen Sklerose indiziert sind. Sie sind insbesondere indiziert bei einem schubförmig-remittierenden Verlauf und reduzieren bei einem Teil der MS-Patienten mit dieser Verlaufsform sowohl Krankheitsaktivität als auch Schubfrequenz. Der genaue Wirkmechanismus sowie die pathophysiologische Grundlagen des Ansprechens auf eine Behandlung mit diesen beiden Medikamenten sind noch unklar.

Es wird vermutet, dass T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie bzw. in der Initiierung und Progression der Multiplen Sklerose spielen. Die Aktivierung von T-Zellen erfordert neben der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und Antigenen, die ihnen von APC's präsentiert werden, auch eine Wechselwirkung zwischen kosignalisierenden Molekülen auf Lymphozyten und deren Liganden auf APC's. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass IFN- β und GA zu einer veränderten Expression von kosignalisierenden Molekülen auf Lymphozyten und Monozyten führen und dies somit eine wichtige Rolle bei ihrer immunmodulatorischen Wirkung spielen könnte.

Auf diesen Erkenntnissen basierend wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von IFN- β und GA auf die Expression verschiedener kostimulatorischer sowie koinhibitorischer Moleküle *in vitro* als auch in MS-Patienten untersucht. Um die

Relevanz der Ergebnisse für den therapeutischen Effekt der IFN- β oder GA-Behandlung zu überprüfen, wurde die veränderte Expression der kosignalisierenden Moleküle mit dem klinischen Ansprechen der Patienten auf die jeweilige Therapie verglichen. Ziel war es, einzelne kosignalisierende Moleküle als prädiktive Marker zu identifizieren, die zu einem möglichst frühen Zeitpunkt ein fehlendes bzw. ein positives Therapieansprechen vorhersagen können.

Die Expression kosignalisierender Moleküle wurde *in vitro* auf PBMC's von fünf gesunden Probanden nach Inkubation mit IFN- β oder GA mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zusätzlich wurden unmittelbar nach venöser Blutentnahme Untersuchungen *ex vivo* durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 32 unbehandelte und 24 IFN- β behandelte MS-Patienten in die Studie eingeschlossen, wobei 13 dieser Patienten zusätzlich im Verlauf der IFN- β -Therapie untersucht wurden. Die Effekte der Therapie mit GA wurden bei 32 unbehandelten und 10 behandelten MS-Patienten untersucht. Davon konnten sechs Patienten in eine Verlaufsstudie eingeschlossen werden.

GA zeigte sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* keine Effekte auf die Expression der untersuchten kosignalisierenden Moleküle auf Lymphozyten. Auf Monozyten hingegen konnte eine signifikante Zunahme der Expression von CD40, CD80 und CD86 *in vitro* nachgewiesen werden. *Ex vivo* ließen sich diese Expressionsänderungen hingegen nicht bestätigen, und somit konnte auch keine Korrelation zu einem Therapieansprechen hergestellt werden.

Unter der Therapie mit IFN- β zeigte sich dagegen eine Zunahme der Expression von CD40, CD80, CD86, PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten, eine Abnahme von PD-1 auf Monozyten sowie eine Steigerung der Expression von PD-L1 auf CD4⁺-T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *ex vivo*.

Zur Verifizierung eines fehlenden oder positiven Ansprechens auf die Therapie, wurden die Patienten auf der Basis von Kurtzkes EDSS-Skala in Bezug auf Krankheitsprogression und Schubfrequenzrate in die Gruppen Responder und Non-Responder eingeteilt. Als Responder wurden die Patienten bezeichnet, die über einen definierten Zeitraum positiv auf die Therapie ansprachen, bei denen es somit zu einer Senkung der Schubfrequenzrate unter der Therapie bzw. zu keiner Krankheitsprogression kam. Non-Responder waren diejenigen Patienten, die über einen definierten Zeitraum nicht auf die Therapie ansprachen und somit eine unveränderte oder erhöhte Schubfrequenz und/oder eine Behinderungsprogression aufwiesen.

Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expressionszunahme von CD40, CD86 und PD-L2 auf Monozyten und einem positiven Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit IFN- β festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass IFN- β sowohl die Expression kostimulatorischer Moleküle wie z.B. CD86 und CD40 aber auch Moleküle wie PD-L1 und PD-L2, die vorwiegend koinhibitorisch wirken *in vitro* und *ex vivo*

verändert. Diese Effekte deuten darauf hin, dass eine Modulation des Gleichgewichts zwischen positiven und negativen kostimulatorischen Signalen eine wichtige Rolle beim Wirkmechanismus von IFN- β bei der Multiplen Sklerose spielt. Da die Expressionsänderungen von CD40, CD86 und PD-L2 auf Monozyten signifikant mit dem Therapieansprechen der untersuchten Patienten korrelieren, könnten diese Oberflächenmoleküle als prädiktive Marker für das klinische Ansprechen auf die IFN- β -Behandlung bei MS-Patienten Verwendung finden.

Künftig sind daher noch weitere Studien mit einer höheren Probanden-/Patientenanzahl notwendig, um genauer zu verifizieren, welche Marker oder welche Kombinationen von Markern geeignet sind, ein klinisches Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β bei der Multiplen Sklerose mit großer Zuverlässigkeit zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Behandlung vorauszusagen.

6. Referenzen

- (1) Hohlfeld R. Therapeutic strategies in multiple sclerosis. I. Immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354(1390):1697-1710.
- (2) Zajicek J. Diagnosis and disease modifying treatments in multiple sclerosis. *Postgrad Med J* 2005; 81(959):556-561.
- (3) Abe K, Takasaki Y, Ushiyama C, Asakawa J, Fukazawa T, Seki M et al. Expression of CD80 and CD86 on peripheral blood T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 1999; 19(1):58-66.
- (4) Chang TT, Jabs C, Sobel RA, Kuchroo VK, Sharpe AH. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1999; 190(5):733-740.
- (5) Harlan DM, Hengartner H, Huang ML, Kang YH, Abe R, Moreadith RW et al. Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(8):3137-3141.
- (6) Perrin PJ, Scott D, Quigley L, Albert PS, Feder O, Gray GS et al. Role of B7:CD28/CTLA-4 in the induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1995; 154(3):1481-1490.
- (7) Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodrooffe MN, Cuzner ML et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1995; 182(6):1985-1996.
- (8) Hein T, Hopfenmuller W. [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 2000; 71(4):288-294.
- (9) Bitsch A, Kuhlmann T, Stadelmann C, Lassmann H, Lucchinetti C, Bruck W. A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001; 49(6):793-796.
- (10) Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; 359(9313):1221-1231.
- (11) Kurtzke JF. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2005; 16(2):327-349.

- (12) Banwell B, Krupp L, Kennedy J, Tellier R, Tenenbaum S, Ness J et al. Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 2007; 6(9):773-781.
- (13) Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46(4):907-911.
- (14) Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 1989; 112 (Pt 1):133-146.
- (15) Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi MM, X et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120 (Pt 6):1085-1096.
- (16) Sadovnick AD, Ebers GC, Wilson RW, Paty DW. Life expectancy in patients attending multiple sclerosis clinics. *Neurology* 1992; 42(5):991-994.
- (17) Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11):1444-1452.
- (18) McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50(1):121-127.
- (19) Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58(6):840-846.
- (20) Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345(5):340-350.
- (21) Sospedra M, Martin R. Antigen-specific therapies in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol* 2005; 24(5-6):393-413.
- (22) Gran B, Hemmer B, Martin R. Molecular mimicry and multiple sclerosis--a possible role for degenerate T cell recognition in the induction of autoimmune responses. *J Neural Transm Suppl* 1999; 55:19-31.
- (23) Padovan E, Giachino C, Cella M, Valitutti S, Acuto O, Lanzavecchia A. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J Exp Med* 1995; 181(4):1587-1591.

- (24) Scherer MT, Ignatowicz L, Winslow GM, Kappler JW, Marrack P. Superantigens: bacterial and viral proteins that manipulate the immune system. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9:101-128.
- (25) Martino G, Furlan R, Brambilla E, Bergami A, Ruffini F, Gironi M et al. Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis. *J Neuroimmunol* 2000; 109(1):3-9.
- (26) Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272(5258):60-66.
- (27) Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2000; 107(2):140-147.
- (28) Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 1997; 120 (Pt 5):865-916.
- (29) Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47(6):707-717.
- (30) Merkelbach S, Kolmel C, Schimrigk K. [Encephalomyelitis disseminata: clinical aspects, pathogenesis and current therapy concepts]. *Radiologe* 2000; 40(11):1036-1044.
- (31) Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987; 330(6145):256-259.
- (32) Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 1988; 336(6194):79-81.
- (33) Dittel BN. CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. *Brain Behav Immun* 2008; 22(4):421-430.
- (34) Raine CS. The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 1994; 36 Suppl:S61-S72.
- (35) Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 79:127-147.
- (36) Chitnis T. The role of CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 79:43-72.
- (37) Ulvestad E, Williams K, Bo L, Trapp B, Antel J, Mork S. HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology* 1994; 82(4):535-541.

- (38) Weiss HA, Millward JM, Owens T. CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 2007; 191(1-2):79-85.
- (39) Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192(3):393-404.
- (40) Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226(3):164-176.
- (41) Soos JM, Schiffenbauer J, Torres BA, Johnson HM. Superantigens as virulence factors in autoimmunity and immunodeficiency diseases. *Med Hypotheses* 1997; 48(3):253-259.
- (42) Mouzaki A, Tselios T, Papathanassopoulos P, Matsoukas I, Chatzantoni K. Immunotherapy for multiple sclerosis: basic insights for new clinical strategies. *Curr Neurovasc Res* 2004; 1(4):325-340.
- (43) Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2008; 4(7):384-398.
- (44) Cross AH, Trotter JL, Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 2001; 112(1-2):1-14.
- (45) O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 2001; 21(2):81-92.
- (46) Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 47(6):694-706.
- (47) Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999; 189(5):865-870.
- (48) Huitinga I, van Rooijen N, de Groot CJ, Uitdehaag BM, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med* 1990; 172(4):1025-1033.
- (49) Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(1):23-35.
- (50) Bruck W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995; 38(5):788-796.

- (51) Bruck W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA et al. Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology* 1996; 195(4-5):588-600.
- (52) de Groot CJ, Ruuls SR, Theeuwes JW, Dijkstra CD, Van d, V. Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56(1):10-20.
- (53) Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(2):116-126.
- (54) Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991; 147(8):2461-2466.
- (55) Verweij CL, Geerts M, Aarden LA. Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF- κ B-like response element. *J Biol Chem* 1991; 266(22):14179-14182.
- (56) Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(14):6586-6590.
- (57) Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 1996; 4(3):321-328.
- (58) Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 1996; 183(6):2541-2550.
- (59) Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3(5):541-547.
- (60) Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* 1995; 270(5238):985-988.
- (61) Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995; 80(5):707-718.
- (62) Boylan MT, Crockard AD, McDonnell GV, Armstrong MA, Hawkins SA. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) expression in multiple sclerosis patients: clinical subtype specific variation in peripheral monocytes and B cells and lack of modulation by high dose methylprednisolone. *J Neurol Sci* 1999; 167(2):79-89.

- (63) Mena E, Rohowsky-Kochan C. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood mononuclear cells in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1999; 100(2):92-96.
- (64) Viglietta V, Bourcier K, Buckle GJ, Healy B, Weiner HL, Hafler DA et al. CTLA4Ig treatment in patients with multiple sclerosis: an open-label, phase 1 clinical trial. *Neurology* 2008; 71(12):917-924.
- (65) Abrams JR, Kelley SL, Hayes E, Kikuchi T, Brown MJ, Kang S et al. Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med* 2000; 192(5):681-694.
- (66) Kremer JM, Dougados M, Emery P, Durez P, Sibia J, Shergy W et al. Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator abatacept: twelve-month results of a phase iib, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52(8):2263-2271.
- (67) Moreland LW, Alten R, Van den BF, Appelboom T, Leon M, Emery P et al. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* 2002; 46(6):1470-1479.
- (68) Houry SJ, Akalin E, Chandraker A, Turka LA, Linsley PS, Sayegh MH et al. CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 1995; 155(10):4521-4524.
- (69) Newell KA, He G, Guo Z, Kim O, Szot GL, Rulifson I et al. Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 163(5):2358-2362.
- (70) Padrid PA, Mathur M, Li X, Herrmann K, Qin Y, Cattamanchi A et al. CTLA4Ig inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness by regulating the development of Th1/Th2 subsets in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(4):453-462.
- (71) Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(3):309-314.
- (72) Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:677-704.

- (73) Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2(3):261-268.
- (74) Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29):10691-10696.
- (75) Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5(12):1365-1369.
- (76) Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 2001; 193(7):839-846.
- (77) Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192(7):1027-1034.
- (78) Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008; 224:166-182.
- (79) Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27(1):111-122.
- (80) Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397(6716):263-266.
- (81) Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999; 402(6763):827-832.
- (82) Wiendl H, Neuhaus O, Mehling M, Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M et al. The CD28 related molecule ICOS: T cell modulation in the presence and absence of B7.1/2 and regulational expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 140(1-2):177-187.
- (83) Nurieva RI. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. *Clin Immunol* 2005; 115(1):19-25.
- (84) Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 1999; 11(4):423-432.

- (85) Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001; 409(6816):97-101.
- (86) Watanabe M, Takagi Y, Kotani M, Hara Y, Inamine A, Hayashi K et al. Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses. *J Immunol* 2008; 180(8):5222-5234.
- (87) Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* 1993; 178(2):669-674.
- (88) van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67(1):2-17.
- (89) Howard LM, Dal Canto MC, Miller SD. Transient anti-CD154-mediated immunotherapy of ongoing relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis induces long-term inhibition of disease relapses. *J Neuroimmunol* 2002; 129(1-2):58-65.
- (90) Hendriks J, Gravestein LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, Borst J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 2000; 1(5):433-440.
- (91) Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 1998; 51(3):682-689.
- (92) Genc K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J Clin Invest* 1997; 99(11):2664-2671.
- (93) Brenner T, Arnon R, Sela M, Abramsky O, Meiner Z, Riven-Kreitman R et al. Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone. *J Neuroimmunol* 2001; 115(1-2):152-160.
- (94) Farina C, Then BF, Albrecht H, Meinl E, Yassouridis A, Neuhaus O et al. Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells. *Brain* 2001; 124(Pt 4):705-719.
- (95) Wiesemann E, Klatt J, Wenzel C, Heidenreich F, Windhagen A. Correlation of serum IL-13 and IL-5 levels with clinical response to Glatiramer acetate in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2003; 133(3):454-460.

- (96) Kozovska ME, Hong J, Zang YC, Li S, Rivera VM, Killian JM et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* 1999; 53(8):1692-1697.
- (97) Rudick RA, Ransohoff RM, Pepler R, VanderBrug MS, Lehmann P, Alam J. Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 40(4):618-627.
- (98) Marckmann S, Wieseemann E, Hilse R, Trebst C, Stangel M, Windhagen A. Interferon-beta up-regulates the expression of co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 on monocytes: significance for treatment of multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(3):499-506.
- (99) Noronha A, Toscas A, Jensen MA. Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1993; 46(1-2):145-153.
- (100) Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquill LR, Maloni H, McFarland HF. VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* 1997; 49(4):1111-1116.
- (101) Gelati M, Corsini E, Dufour A, Massa G, La Mantia L, Milanese C et al. Immunological effects of in vivo interferon-beta1b treatment in ten patients with multiple sclerosis: a 1-year follow-up. *J Neurol* 1999; 246(7):569-573.
- (102) Leppert D, Waubant E, Burk MR, Oksenberg JR, Hauser SL. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 40(6):846-852.
- (103) Stuve O, Dooley NP, Uhm JH, Antel JP, Francis GS, Williams G et al. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 1996; 40(6):853-863.
- (104) Wieseemann E, Deb M, Hemmer B, Radeke HH, Windhagen A. Early identification of interferon-beta responders by ex vivo testing in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2008; 128(3):306-313.
- (105) Vartanian T, Solberg SP, Rice G. Impact of neutralizing antibodies on the clinical efficacy of interferon beta in multiple sclerosis. *J Neurol* 2004; 251 Suppl 2:II25-II30.
- (106) Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1971; 1(4):242-248.
- (107) Teitelbaum D, Webb C, Meshorer A, Arnon R, Sela M. Protection against experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 1972; 240(5383):564-566.

- (108) Scheindlin S. Copolymer 1: an off-beat drug development story. *Mol Interv* 2004; 4(1):6-9.
- (109) Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. Cop 1 as a candidate drug for multiple sclerosis. *J Neural Transm Suppl* 1997; 49:85-91.
- (110) Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Crystal H, Drexler E et al. A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-relmitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1987; 317(7):408-414.
- (111) Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995; 45(7):1268-1276.
- (112) Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP et al. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1998; 50(3):701-708.
- (113) Liu C, Blumhardt LD. Benefits of glatiramer acetate on disability in relapsing-remitting multiple sclerosis. An analysis by area under disability/time curves. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *J Neurol Sci* 2000; 181(1-2):33-37.
- (114) Comi G, Filippi M, Wolinsky JS. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol* 2001; 49(3):290-297.
- (115) Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Fulton J, Constantinescu CS, Gonzales-Scarano F et al. Glatiramer acetate (Copaxone) treatment in relapsing-remitting MS: quantitative MR assessment. *Neurology* 2000; 54(4):813-817.
- (116) Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:297-322.
- (117) Gran B, Tranquill LR, Chen M, Bielekova B, Zhou W, Dhib-Jalbut S et al. Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology* 2000; 55(11):1704-1714.
- (118) Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Then BF, Dose T et al. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from

- treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13):7452-7457.
- (119) Qin Y, Zhang DQ, Prat A, Pouly S, Antel J. Characterization of T cell lines derived from glatiramer-acetate-treated multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2000; 108(1-2):201-206.
- (120) Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JI, Hafler DA. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2000; 105(7):967-976.
- (121) Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S et al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 1998; 92(1-2):113-121.
- (122) Fellay B, Chofflon M, Juillard C, Paunier AM, Landis T, Roth S et al. Beneficial effect of co-polymer 1 on cytokine production by CD4 T cells in multiple sclerosis. *Immunology* 2001; 104(4):383-391.
- (123) Gironi M, Bergami A, Brambilla E, Ruffini F, Furlan R, Comi G et al. Immunological markers in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2000; 21(4 Suppl 2):S871-S875.
- (124) Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J Neurol* 2004; 251 Suppl 5:v12-v29.
- (125) Pachner AR. An improved ELISA for screening for neutralizing anti-IFN-beta antibodies in MS patients. *Neurology* 2003; 61(10):1444-1446.
- (126) Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D. MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. *Mol Diagn* 2003; 7(1):17-25.
- (127) Hong J, Zang YC, Hutton G, Rivera VM, Zhang JZ. Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004; 152(1-2):126-139.
- (128) Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S et al. Microarray analysis identifies interferon beta-regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 139(1-2):109-118.
- (129) Sturzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P et al. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126(Pt 6):1419-1429.

- (130) Wiesemann E, Sonmez D, Heidenreich F, Windhagen A. Interferon-beta increases the stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells to induce IL-13, IL-5 and IL-10 in autologous T-cells. *J Neuroimmunol* 2002; 123(1-2):160-169.
- (131) Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol* 2000; 165(1):548-557.
- (132) Liu Z, Pelfrey CM, Cotleur A, Lee JC, Rudick RA. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001; 112(1-2):153-162.
- (133) Fillion LG, Matusevicius D, Graziani-Bowering GM, Kumar A, Freedman MS. Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2003; 106(2):127-138.
- (134) Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11(2):141-151.
- (135) Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005; 58(1):50-57.
- (136) Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung HP, Weller M et al. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004; 155(1-2):172-182.
- (137) Dong H, Strome SE, Matteson EL, Moder KG, Flies DB, Zhu G et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2003; 111(3):363-370.
- (138) Liu X, Gao JX, Wen J, Yin L, Li O, Zuo T et al. B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med* 2003; 197(12):1721-1730.
- (139) Avolio C, Filippi M, Tortorella C, Rocca MA, Ruggieri M, Agosta F et al. Serum MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios in multiple sclerosis: relationships with different magnetic resonance imaging measures of disease activity during IFN-beta-1a treatment. *Mult Scler* 2005; 11(4):441-446.

- (140) Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The interleukin-10 levels as a potential indicator of positive response to interferon beta treatment of multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2006; 108(7):644-647.
- (141) Batocchi AP, Rotondi M, Caggiula M, Frisullo G, Odoardi F, Nociti V et al. Leptin as a marker of multiple sclerosis activity in patients treated with interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2003; 139(1-2):150-154.
- (142) Boxel-Dezaire AH, Trigt-Hoff SC, Killestein J, Schrijver HM, van Houwelingen JC, Polman CH et al. Contrasting responses to interferon beta-1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: does baseline interleukin-12p35 messenger RNA predict the efficacy of treatment? *Ann Neurol* 2000; 48(3):313-322.
- (143) Casoni F, Merelli E, Bedin R, Sola P, Bertolotto A, Faglioni P. Is serum neopterin level a marker of responsiveness to interferon beta-1a therapy in multiple sclerosis? *Acta Neurol Scand* 2004; 109(1):61-65.
- (144) Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Castellazzi M, Govoni V, Caniatti L et al. Beneficial effect of interferon-beta 1b treatment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with an increase in serum levels of soluble HLA-I molecules during the first 3 months of therapy. *J Neuroimmunol* 2004; 148(1-2):206-211.
- (145) Laske C, Oschmann P, Tofighi J, Kuehne SB, Diehl H, Bregenzer T et al. Induction of sTNF-R1 and sTNF-R2 by interferon beta-1b in correlation with clinical and MRI activity. *Acta Neurol Scand* 2001; 103(2):105-113.
- (146) Muraro PA, Liberati L, Bonanni L, Pantalone A, Caporale CM, Iarlori C et al. Decreased integrin gene expression in patients with MS responding to interferon-beta treatment. *J Neuroimmunol* 2004; 150(1-2):123-131.
- (147) Petzold A, Brassat D, Mas P, Rejdak K, Keir G, Giovannoni G et al. Treatment response in relation to inflammatory and axonal surrogate marker in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004; 10(3):281-283.
- (148) Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Pepler R, Yu M, Mathisen PM et al. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 1998; 50(5):1294-1300.
- (149) Sellebjerg F, Ross C, Koch-Henriksen N, Sorensen PS, Frederiksen JL, Bendtzen K et al. CD26 + CD4 + T cell counts and attack risk in interferon-treated multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11(6):641-645.
- (150) Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Hanninen A, Eralinna JP, Panelius M. Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS. *J Neuroimmunol* 2005; 167(1-2):175-182.

-
- (151) Wandinger KP, Lunemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A et al. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 2003; 361(9374):2036-2043.
- (152) Wergeland S, Beiske A, Nyland H, Hovdal H, Jensen D, Larsen JP et al. IL-10 promoter haplotype influence on interferon treatment response in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2005; 12(3):171-175.
- (153) Wiesemann E, Deb M, Trebst C, Hemmer B, Stangel M, Windhagen A. Effects of interferon-beta on co-signaling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes in relation to clinical response to interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14(2):166-176.
- (154) Racke MK, Scott DE, Quigley L, Gray GS, Abe R, June CH et al. Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1995; 96(5):2195-2203.
- (155) Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS. Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2007; 4(4):647-653.

Lebenslauf

Name: Milani Deb
Geburtsdatum und -ort: 22. August 1982 in Salzgitter
Anschrift: Adalbert-Stifter-Str. 9, 30655 Hannover
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1988-1992 Grundschole St. Michael, Salzgitter
1992-1994 Orientierungsstufe An der Goethestraße, Salzgitter
1994-2001 Kranich-Gymnasium, Salzgitter
1999 North Penn High School, Lansdale, PA, USA
2001 Abitur

Hochschulbildung

10/2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
08/2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
2003-2006 Famulaturen
Neurologie, Städtisches Klinikum Braunschweig
Chirurgie, Centralsjukhuset Kristianstad, Schweden
Innere Medizin, Henriettenstiftung, Hannover
Gynäkologie, Krankenhaus St. Josef, Braunau, Österreich
Neurologie, Whipps Cross University Hospital/National Hospital of Neurology and Neurosurgery, London, UK

Neurochirurgie, Carolinas Medical Center, Charlotte, NC,
USA

Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Meckoni, Lengede

08/2006-07/2007

Praktisches Jahr

Innere Medizin, Klinikum Salzgitter GmbH, Salzgitter

Neurologie, Medizinische Hochschule Hannover

Chirurgie, Agnes-Karll-Krankenhaus, Hannover

12/2007

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen 1-3)

Studienbegleitende Lehrtätigkeiten

2003

Tutorin Biologie, Medizinische Hochschule Hannover

2005

Tutorin Physiologie, Medizinische Hochschule Hannover

Berufstätigkeit

Seit 03/2008

Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin der
Neurologischen Klinik der Medizinischen Hochschule
Hannover

Zusätzliche Qualifikationen

02/2009

Schulung ICH-GCP für Prüfärzte inkl. AMG und GCP-
Verordnungen

Hannover, den 28.10.2009

Veröffentlichungen

Wiesemann E, **Deb M**, Hemmer B, Radeke HH, Windhagen A. Early identification of Interferon-beta responders by ex vivo testing in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2008, 128, 306-313.

Wiesemann E, **Deb M**, Trebst C, Hemmer B, Stangel M, Windhagen A. Effects of Interferon-beta on co-signalling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes in relation to clinical response to Interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008, 14, 166-176.

Kongressbeitrag/Auszeichnung

Elke Wiesemann, **Milani Deb**, Daniela Sönmez, Anja Windhagen: Poster-Preis der Deutschen Gesellschaft für Neurologie zum Thema "Statine hemmen die Sekretion von IL-5 und IL-13 in autologen T-Zellen über eine verminderte Expression von PD-L1 und PD-L2 auf dendritischen Zellen" 2007.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Effekte von immunmodulatorischer Therapie mit Interferon- β und Glatiramerazetat auf die Expression kosignalisierender Moleküle bei Patienten mit Multipler Sklerose“ in der Neurologischen Klinik mit klinischer Neurophysiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Anja Windhagen ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Teilergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Journal of Clinical Immunology, Vol. 128, pp 306-313 (2008)

Journal of Multiple Sclerosis, Vol. 14, pp 166-176 (2008)

Hannover, den 28.10.2009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Dengler danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Neurologischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover durchführen zu dürfen sowie für die freundliche Unterstützung und die ermutigenden Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Anja Windhagen für das interessante Thema und die ausgezeichnete Betreuung dieser Dissertation. Insbesondere danke ich ihr für die Geduld, Motivation und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. med. Elke Voß möchte ich mich herzlich für ihre Offenheit, ihre Geduld, die stets motivierenden und aufbauenden Worte sowie für ihre unermüdliche Hilfe bei der Durchführung dieser Dissertation bedanken.

An dieser Stelle danke ich auch ganz besonders meiner Mutter, meinem Vater sowie meinem Bruder für deren stetige Unterstützung während meines Studiums und bei der Fertigstellung dieser Promotionsarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Bijon Chatterji, der mich während meines Studiums und vor allem während meiner Doktorarbeit immer unterstützt hat. Ich danke ihm für die Motivation, für die kritische Durchsicht und die stets liebevollen Worte.